Deuxième édition du texte édité en 1956 par la COMMISSION SERICICOLE INTERNATIONALE

SÉRIE C, Nº
Nº D'ORDRE :
62

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Constantin VAGO

1re THÈSE

L'ENCHAINEMENT DES MALADIES CHEZ LES INSECTES

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 29 mai 1956 devant la Commission d'examen :

MM. ABELOOS *Président.*
BENOIT
TIMON-DAVID *Examinateurs.*
SENEZ

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler – Paris

1956

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547010_0005

SÉRIE C, N° 62
N° D'ORDRE : 62

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Constantin VAGO

1re THÈSE

L'ENCHAINEMENT DES MALADIES CHEZ LES INSECTES

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 29 mai 1956 devant la Commission d'examen :

MM. ABELOOS — *Président.*
BENOIT, TIMON-DAVID, SENEZ — *Examinateurs.*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler – Paris

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

MORT AU CHAMP D'HONNEUR :
M. F. MARTY,
Maître de Conférences de Mathématiques.
(14 JUIN 1940)

DOYENS ET PROFESSEURS HONORAIRES : MM. MARCHAUD, E. TRAYNARD.

PROFESSEURS HONORAIRES : MM. M. CAULLERY, J. PERES, G. PETIT, J. BOSLER, M. KOLLMANN, R. THIRY, A. TIAN.

MAITRES DE CONFÉRENCES HONORAIRES : MM. H. BIMAR, D. RICARD.

Doyen : M. P. CHOUX.

Assesseur : M. P. ROUARD.

Secrétaire Principal : M. C. MOYNAULT.

PROFESSEURS :

MM. L. MARGAILLAN, Chimie Industrielle.
G. CORROY, Géologie et Minéralogie.
P. CHOUX, Botanique Générale.
R. CERIGHELLI. Agronomie Tropicale.
J. VALENSI, Mécanique des Fluides.
P. ROUARD, Physique Générale.
P. DESNUELLE, Chimie Biologique.
M. ABELOOS, Zoologie Générale.
R. MERIGOUX, Physique Industrielle.
P. VINCENSINI, Calcul différentiel et Intégral.
H. CALVET, Chimie Générale.
P. BENOIT, Physiologie.
C. FEHRENBACH, Astronomie.
A. FAVRE, Mécanique de l'atmosphère.
H. CABANNES, Mécanique Rationnelle.
A. GUILLEMONAT, Chimie M.P.C.
J.-M. PERES, Biologie Animale S.P.C.N.

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. C. JAUSSERAN, Physique M.P.C.
R. MOLINIER, Biologie Végétale.
G. CARPENI, Chimie S.P.C.N.
P. COTTON, Physique P.C.B. S.P.C.N.
MM. J. METZGER, Chimie P.C.B.
J. TIMON-DAVID, Biologie Animale P.C.B.
L. FOURES, Mathématiques Générales.
Mme Y. FOURES, Méthodes Mathématiques de la Physique.

MAITRES DE CONFÉRENCES :

M. G. BODIOU, Mathématiques M.P.C.
Mlle M. GONTCHAROFF, Biologie Marine.
MM. M. NAUDET, Chimie des Corps Gras.
D. MALE, Physique Générale.
R. ACHER, Chimie Biologique.

CHARGÉS DE CONFÉRENCES :

M. G. MALCUIT, Botanique Appliquée.
Mme S. TAXY-FABRE, Géographie Physique et Appliquée.
MM. B. GOUZON, Physiologie.
C. GOUVERNET, Géologie.
J. MORIN, Physiologie Générale.
DELPECH, Psychologie.
CHARLIER DE CHILLY, Mathématiques.
J. BRUN, Mathématiques.
P. METRAL, Mathématiques.
G. DURAND, Physique.
Mlle GAVINI, Psycho-Physiologie.
MM. J. CHOUTEAU, Physiologie Générale.
L. GAFFIER, Biologie Végétale.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MES MAITRES HANKO et SZENT GYORGYI,

A MON PROFESSEUR CSUKAS,

mes initiateurs en pathologie comparée.

Mes sincères remerciements à M. le Professeur ABELOOS pour l'intérêt porté à mes travaux et l'honneur qu'il m'a fait de présider le Jury.

A MM. les Professeurs BENOIT, TIMON-DAVID et SENEZ pour leur bienveillant appui.

Ma reconnaissance à M. SCHENK, pour son esprit d'initiative et de décision, son aide morale et matérielle qui ont permis à ce travail de voir le jour et à mes hypothèses de recherches d'être vérifiées et diffusées. Je lui dédie cet ensemble comme démonstration de sa conviction exprimée dès 1948, au VII[e] Congrès Sériciole International dans le ver à soie " type biologique ".

Mes sentiments dévoués à M. TROUVELOT, Directeur de la Station Centrale de Zoologie Agricole pour ses précisions entomologiques et l'aide constante apportée à moi-même et à mes travaux ainsi qu'à M. GRISON pour les échanges de vues très précieux sur les relations entre les études d'entomologie et de pathologie.

Mes sentiments de gratitude au Professeur TOUMANOFF de l'Institut Pasteur, spécialiste de la pathologie des insectes pour son aide, ses critiques et suggestions.

A M. le Professeur LEPINE de l'Institut Pasteur, pour la très bienveillante mise à ma disposition de sa haute autorité en matière de virologie et de son organisation de microscopie électronique.

Mes sentiments amicaux à mon collègue M. FRAISSE, aux Docteurs GERLACH, BERGOLD, STEINHAUS et ROUX, Professeurs d'Université et Chefs de Services à VIENNE (Autriche), SAULT S[te] MARIE (Canada), BERKELEY (U. S. A.) et MONTPELLIER (France), pour les échanges de vues et suggestions.

Merci pour l'effort très dévoué de M[lle] CHASTANG lors des expériences et des mises au point.

Pour l'aide désintéressée de M. FOSSET, de M[me] CHAVIER et de M[lle] BONNET.

Et pour le souci et les soins pris par M. LEGAY R. et M[lle] ROURE en vue de présenter cet ensemble.

L'ENCHAINEMENT DES MALADIES CHEZ LES INSECTES

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES EN PATHOLOGIE COMPARÉE

L'ENCHAINEMENT DES MALADIES CHEZ LES INSECTES

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES EN PATHOLOGIE COMPARÉE

PAR

C. VAGO

Station de Recherches Séricicoles d'Alès,
Institut National de la Recherche Agronomique

INTRODUCTION

Après plus de deux siècles de recherches visant dans tous les domaines de la pathologie à définir les processus pathologiques comme des entités morbides, une tendance se dessinant à l'heure actuelle révèle *la difficulté qu'on éprouve à expliquer de nombreux états pathologiques en se basant sur la seule unité « maladie »*.

Il nous a semblé que le domaine de la pathologie des Insectes serait susceptible de contribuer tout particulièrement à améliorer nos connaissances dans cette voie nouvelle. En effet, chez ce groupe d'animaux une perspective particulièrement large sur les processus pathologiques est assurée grâce à la fréquence des générations, au grand nombre des descendants et à la possibilité d'observer d'importantes populations ce qui assure l'aisance relative des évaluations statistiques.

Les Insectes sont sujets naturellement à de nombreuses maladies et on sait, grâce aux travaux réalisés depuis plus d'un siècle, que leurs populations subissent des épizooties ou enzooties souvent graves et capitales pour leur devenir.

L'étude de ces phénomènes présentant des intérêts théoriques et pratiques, de nombreux auteurs ont procédé à la mise en évidence des agents pathogènes et à la caractérisation des affections. Aussi, connaissons-nous actuellement un grand nombre de bactéries, cryptogames, protozoaires et virus attaquant les Insectes et de nombreuses maladies infectieuses ou physiologiques sont décrites comme entités morbides ou léthales.

Or, au fur et à mesure que les données à ce sujet se multiplient on se rend compte que certaines affections pathologiques ne peuvent pas

être expliquées par l'approfondissement de leur seule entité. Les symptômes sont quelquefois atypiques, les lésions variables et non constantes et les conditions d'apparition contradictoires ; dans d'autres cas, il est possible de suivre presque entièrement une maladie et c'est au moment des essais de reproduction expérimentale ou lors de la considération d'une extension épizootique qu'on se trouve en présence de symptômes ou de lésions n'entrant pas dans le cadre du processus.

Bien que de tels phénomènes ne soient pas étudiés en détail, car ils sont considérés comme des aberrations dues à des causes inconnues, on a été obligé d'en tenir compte car des problèmes économiquement importants ne sont pas résolus à cause de la confusion créée par eux. L'une des maladies les plus importantes du Ver à Soie, la flacherie, pourrait être citée comme un exemple typique de la diversité des agents pathogènes mis en évidence et des contradictions dans les processus dont elle témoigne : toutes raisons ayant entraîné des discussions très vives entre les chercheurs.

Ainsi donc ces questions qui se posent dans le domaine de la pathologie des Insectes reflètent fidèlement un problème aigu de pathologie comparée. Nous pensons que leur étude dans ce cadre systématique restreint permettra, tout en travaillant sur des problèmes entomo-pathologiques précis, de contribuer à cette orientation actuelle de la pathologie en général.

*
* *

L'impossibilité de se baser sur une seule action microbienne ou physio-pathologique, amène naturellement à la notion du « *complexe* » qui symbolise la prise en considération des lésions, des processus pathologiques ou des réactions *précédant ou suivant un syndrome*. C'est le nombre des données sur de tels complexes spontanés qui a constitué la phase préliminaire de nos travaux dont les débuts remontent avec observations occasionnelles à une dizaine d'années.

Le problème s'est précisé de lui-même à partir du moment où dans les complexes spontanés sur Insectes, ont été notées, d'une façon simultanée certaines caractéristiques très différentes de celles qui constituaient le syndrome principal. Les travaux ont été alors orientés vers l'étude analytique de chacune des affections pouvant être mise en évidence au sein des complexes. Ces recherches n'ont cependant pas été considérées autrement qu'une phase intermédiaire précisant qu'un état pathologique peut présenter à la fois les traces de plusieurs affections, sans aller toutefois jusqu'à la détermination des rapports entre les différentes actions successives.

C'est pour arriver à ce dernier stade, essentiel pour la notion de

complexe que nous avons envisagé de réaliser expérimentalement la succession des effets pathologiques les plus approchés possible des cas naturels. Les rapports mis en évidence au cours de ces travaux nous ont fait avancer de plus en plus vers la considération de certains états pathologiques se présentant sous la définition clinique de « complexe », comme une *combinaison ou un enchaînement d'éléments de pathogénèse* souvent très différents.

*
* *

Les modalités de combinaison des affections pathologiques sous forme de « complexe » se sont révélées extrêmement variées aussi bien au point de vue des lésions que de l'agent pathogène et de la nature des rapports entre les éléments. Presque chaque cas représente un enchaînement différent et c'est pour cette raison que nous présentons ces travaux sous la forme de chapitres dont chacun est consacré à un complexe. Afin de pouvoir donner malgré tout une idée assez complète de la gamme des complexes examinés, nous avons essayé de les grouper dans des types d'enchaînement et nous traitons un des cas les plus caractéristiques de chaque type. Ainsi, nous nous arrêterons sur un complexe constitué d'une action virale préalable suivie d'une septicémie bactérienne, sur l'évolution d'une infection bactérienne subaiguë vers des syndromes différents, sur l'influence des blessures vis-à-vis des infections ultérieures, sur les effets des infections chroniques au moment de la nymphose, et enfin sur la combinaison des troubles métaboliques avec l'évolution de viroses aiguës.

Il paraît non seulement utile mais indispensable d'uniformiser les relevés des travaux et des résultats pour chacun des types de complexes. En effet, pour la compréhension des données sur la reproduction expérimentale et les travaux histologiques, l'historique de la mise en évidence progressive des divers éléments de l'enchaînement est nécessaire. C'est pourquoi l'origine de cette mise en évidence de chacun des éléments du complexe est exposée à partir des cas observés dans la nature ou dans les élevages. Ensuite chacune des affections élémentaires est analysée à part. Les liens entre les affections sont recherchés par le moyen de la reproduction expérimentale et enfin la nature de ces liens est approfondie grâce à l'étude de la pathogénèse.

Dans ce travail, nous avons réuni uniquement les exemples d'enchaînement qui ont pu être examinés *expérimentalement* sur un même « type biologique » : le Lépidoptère *Bombyx mori* L. Ainsi, toutes les recherches de reproduction et de pathogénèse relatées, concernent cet Insecte quels que soient les Insectes hôtes sur lesquels les premiers signes *spontanés* des complexes ont été observés.

C'est par la comparaison des types de complexes, à la fois au point de vue clinique et au point de vue analyse de la pathogénèse, qu'il nous semble possible d'apporter une contribution d'abord à une meilleure connaissance des maladies atypiques souvent économiquement importantes dans le monde des Insectes, ensuite à une orientation de la pathologie comparée concernant l'étude des états *prépathologiques*.

Chapitre Premier

MÉTHODES ET MATÉRIEL

La mise en évidence et l'analyse des complexes pathologiques ont nécesssité la définition des lésions tissulaires et cellulaires, l'isolement, la purification et l'étude des agents pathogènes, l'établissement des diagnostics pathologiques et le test de virulence des germes entomophytes. Elles ont demandé également la réalisation expérimentale des processus pathologiques et la création des conditions de prédisposition.

Les méthodes mises en œuvre relèvent ainsi des domaines de la cyto et histo-pathologie, de la microbiologie et de la pathologie expérimentale.

Nous résumerons ici celles qui sont particulièrement intéressantes pour le problème étudié, ou qui ont été mises au point en vue de la réalisation de certains effets spéciaux.

MÉTHODES CYTO ET HISTO-PATHOLOGIQUES

Elles ont été employées pour deux raisons. D'abord pour rechercher les lésions simultanées de plusieurs affections spontanées, ensuite pour suivre leur succession lors des reproductions expérimentales.

Les objets ont été fixés « in toto » ou bien par organes prélevés séparément après dissection. Cette dernière opération s'est toujours effectuée à sec et non dans l'eau afin d'éviter le déplacement des germes, source d'erreurs dans l'interprétation pathologique.

La plupart des pièces ont été fixées dans le liquide de Bouin. C'est en prévision de certaines colorations cytologiques (pour mitochondries par exemple) que le formol salé a été employé en complément.

Pour les travaux histologiques au microscope électronique, le seul fixateur employé a été l'acide osmique. La technique donnant les meilleurs résultats pour la reconnaissance des corps élémentaires des virus entomophytes sur la chromatine nucléaire a consisté en un perfectionnement et une adaptation d'un procédé employé au Service du Docteur Lepine à l'Institut Pasteur (Lepine, Croissant, 1953). En effet, en raison de l'anatomie et de la physiologie des larves de Lépidoptères, il a été possi-

ble de faire entraîner par l'hémolymphe circulant dans la cavité générale, une solution d'acide osmique tamponnée avec du véronal, ce dernier ramenant la concentration définitive à 2 p. 100. Cette opération est conditionnée par une prise de sang simultanée à l'introduction du fixateur et dont l'importance est déterminée automatiquement par celle du fixateur lui-même (Vago, Croissant, Lepine, 1955). Cette technique, effectuée à 0° C., donne une finesse de structure incomparablement supérieure à celle obtenue avec d'autres méthodes et notamment à celles basées sur l'action du formol.

Les pièces destinées à des examens au microscope à lumière ont été incluses dans de la paraffine à 56° C. et quelques essais ont été également réalisés avec une cire synthétique hydrosoluble. Cette dernière venait d'être commercialisée sous le nom de « Crémolan » et a offert des possibilités de changements de dureté par mélange des fractions d'indices 34 à 90.

Signalons la technique d'imprégnation de la paraffine sous rayons infra-rouges que nous avons employée de préférence à celle généralement utilisée (plaque chauffante). Pour la paraffine à 56°, en travaillant dans un air ambiant à 20° C., un tube émetteur de 500 watts placé à une distance de 26 à 28 centimètres a donné une homogénéité et une commodité de travail remarquables.

Pour la microscopie électronique, les inclusions ont été effectuées après déshydratation et passages dans le monomère de métacrylate de butyle. Le dernier passage dans ce même produit additionné de 1 p. 100 de péroxyde de benzoyle constitue l'inclusion, après polymérisation à 54° C. pendant 12 heures environ.

Les colorations vitales ont été relativement peu employées. Le soudan III a toutefois permis certains effets discriminatifs entre les globules de lipides, les urates et les sporozoaires. La coloration négative à la nigrosine a rendu de grands services dans les examens des corps d'inclusion des viroses et des cristalloïdes des bactéries du groupe *Thuringiensis*.

Les préparations hématologiques et les prélèvements intestinaux ont toujours été colorés d'abord selon Pappenheim en vue d'un premier examen. Des effets spéciaux pour distinguer certains éléments pathologiques ont été obtenus avec : le bleu victoria (Vago, 1952 a) pour le contour des corps d'inclusion des virus, la fuchsine de Ziehl chauffée et Fontana-Tribondeau (Paillot, 1934 a, 1936) pour les inclusions des granuloses, la coloration combinée dibrome-oxymercurifluoresceine-bleu de méthylène (Vago, 1952 c) pour la séparation des spores. Les techniques courantes de Gram et de Ziehl-Nielsen ont été utilisées également.

L'hémalun combiné avec l'érythrosine ou l'éosine-orange a été employé d'une façon systématique comme coloration pour les coupes

histologiques car elle reproduit d'une façon neutre les structures tissulaires. Les différenciations par contraste de couleurs ont été réalisées avec les techniques de MALLORY (1900), de PRENANT et par le bleu victoria (VAGO, 1952 a). Les altérations de la séricine, de la fibroïne, de la chitine, des noyaux, du cytoplasme et des sécrétions intestinales, ont été nuancées par la polychromie de la fuchsine acide et du vert sulfo.

Les corps d'inclusion des virus, les spores des protozoaires et le mycélium cryptogamique, ont pu être accentués parmi d'autres éléments cellulaires grâce à une régression contrôlée de la coloration à l'hématoxyline ferrique (HEIDENHAIN, 1892). La combinaison du principe de GRAM avec l'huile d'aniline a favorisé, dans certains cas, la reconnaissance des bactéries intracellulaires.

MÉTHODES MICROBIOLOGIQUES

L'isolement des cryptogames pathogènes a été effectué sur milieux Sabouraud glucosé, Sabouraud pauvre, pomme de terre, pruneaux, malt, tous glucosés ou non (formules de SMITH, 1947, HEIM, 1949, Society of American Bacteriologists, 1952).

L'isolement des bactéries a toujours été réalisé sur gélose nutritive pH 7 et sur gélose aux œufs (formule WHITE, TOUMANOFF, 1919, 1951). Pour une étude plus détaillée, les milieux réactifs de l'Institut Pasteur ont été employés.

Lors des isolements, l'addition aux divers milieux d'un extrait d'œufs de *Bombyx mori* L. (VAGO, VASILJEVIC, 1954) a favorisé le développement de certains germes entomophytes par rapport à celui d'autres colonies sans affinités spéciales vis-à-vis des Insectes.

Enfin la technique d'isolement à l'aide de micro-ampoules (VAGO, CHASTANG, sous presse) a constitué un élément important des diagnostics en série.

L'étude des virus a été poursuivie avec filtrations sur bougies Chamberland L2, L3 et L4 ainsi qu'avec purifications de corps d'inclusion par centrifugations et homogénéisations alternées et fractionnées. La vitesse de centrifugation discriminative a dû être déterminée presque pour chaque espèce hôte à cause de la différence de taille des corps d'inclusion. Elle est située pour les polyèdries entre 4 et 7 000 t/m et pour les granuloses entre 6 et 8 000 t/m.

Les virus eux-mêmes ont été purifiés dans certains cas. La dissolution des corps d'inclusion par traitement à NaOH à 1 pour 10 000 pendant 20 minutes ou par l'action de détergents (surtout le Teepol) pendant des durées variables, a précédé la sédimentation des corps élémentaires. Celle-ci a été effectuée à environ 11 000 t/m pour les virus

allongés (*Borrelina*, *Bergoldia*) et 15 à 16 000 t m pour les virus punctiformes (*Smithia*) (Centrifugeuse Servall, type SS 1 A).

Le classement des germes étudiés au point de vue systématique, a toujours été soumis à l'avis des spécialistes de chacun des groupes ; pour les bactéries les Professeurs LEMOIGNE et BUTTIAUX de l'Institut Pasteur de Paris et de Lille, et pour les cryptogames le Professeur HEIM et Mme NICOT du Museum National d'Histoire Naturelle de Paris, le Docteur GENTLES de l'Université de Cambridge et Mme WESTERDIJK de Baarn (Hollande). Certaines relations ont eu lieu par l'intermédiaire du Centre de Collections de Types Microbiens de Lausanne (Professeur HAUDUROY). Tous les virus ont été déterminés par nous-même.

MÉTHODES DE PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE

L'inoculation des larves avec la matière infectieuse a été effectuée après désinfection préalable de la cuticule à l'alcool iodé et flambage. L'injection elle-même a été obtenue à l'aide d'un système de seringue à éléments stérilisables et interchangeables. La quantité de suspension virulente est envoyée dans des micro-pipettes doublement effilées par l'intermédiaire de la pression d'air d'une micro-seringue (Fonbrune). Le conditionnement des matières infectieuses injectées était assez varié, il sera traité séparément dans chaque chapitre.

Dans certains cas, l'infection des Insectes a été réalisée dans une cage aseptique préalablement traitée aux rayons ultra-violets germicides 2537 A°. Pour les contaminations par voie buccale, il était important, en dehors du dosage des solutions infectantes (précisé dans chaque chapitre), de rendre comparables les quantités d'aliments ingérés. La régularité avec laquelle l'alimentation de *Bombyx mori* peut être dosée a permis d'obtenir des infections comparables à tous points de vue : durée et chronologie du repas infectant en relation avec la date des mues.

Un des points essentiels pour l'obtention expérimentale des états de prédisposition a été la réalisation de conditions atmosphériques particulières. Elle a entraîné des mises au point préalables pour chaque cas.

Les variations brusques de température et d'hygrométrie ont été obtenues dans une chambre climatisée, transformée à cet effet. L'envoi et la reprise de l'air dans une « gaine de climatisation » extérieure à la pièce a permis par exemple de monter en 10 minutes de 20 à 35°C. et au bout du même laps de temps, de passer de 40 à 92 p. 100 d'humidité relative.

Certains essais ont exigé un microclimat précis pour chacune des larves maintenues en élevages individuels. Ici, le principe définitif adopté, a été l'établissement d'un circuit d'air constant à l'intérieur d'une pièce déjà climatisée. Cet effet a été obtenu par différence de température sur

les deux faces de cases individuelles superposées. Le mouvement d'air ascendant limité à un côté, entraîne ainsi avec une vitesse remarquablement uniforme, l'air de la pièce à travers toutes les cases.

L'obtention des conditions de la « touffe », facteur très important pour les prédispositions pathologiques a été particulièrement difficile (toutes les tentatives signalées dans la littérature entomopathologique visant à la reproduction de la flacherie de la « touffe » montrent l'impossibilité de réaliser ces conditions). Il s'agit essentiellement de créer dans une enceinte close, des matelas d'air horizontaux sans qu'aucun échange d'air ne se produise par différences de densité en fonction de la température. L'installation, mise au point à ce sujet, consiste en une étuve de verre avec emplacement du chauffage électrique immédiatement sous son plafond. Cette première étuve est posée dans une deuxième munie d'une installation électrique semblable. L'ensemble se trouve dans une pièce isolée sur la totalité de ses faces par une double couche de liège. Cette pièce est également chauffée par le haut. La température de chaque masse d'air se trouvant entre deux étuves est déterminée par des thermostats en série réglés de 2 en 2 degrés en allant de l'extérieur vers l'intérieur. L'humidité n'est précisée que dans le volume central. L'expérience se déroule uniquement dans l'étuve intérieure et le seul moyen de communication (éventuellement pour alimentation) se fait par un tuyau traversant l'espace intermédiaire et normalement fermé aux deux extrémités. La formation de matelas d'air et la température des couches d'air intérieures sont contrôlées par un jeu de thermomètres lisibles tous à la fois.

Les essais relatifs à l'activation des viroses inapparentes ainsi que la comparaison des blessures infectées par divers germes ont dû être effectués sur élevages individuels afin d'éviter les contaminations. (Cette exigence a été d'ailleurs respectée d'une façon générale dans tous nos essais de reproduction des maladies). Deux systèmes ont été employés : casiers individuels et parallèles ouverts sur le devant et à la partie supérieure, et flacons individuels stériles à dimensions calculées en fonction des âges. La fermeture de ces flacons a dû être dans certains cas assurée au coton hydrophile, dans d'autres, et notamment pour les élevages durant la vie larvaire, un système de double ouverture avec différence de températures des surfaces opposées a été mis au point, permettant d'une façon simple et précise, un échange d'air constant.

La désinfection du chorion des œufs a été appliquée couramment et était indispensable dans certains cas. La technique adoptée a été définie par la détermination simultanée de la destruction des corps d'inclusion des virus à la surface du chorion et du degré de nocivité des traitements viricides vis-à-vis de l'embryon. Les œufs, entre la pré-incubation et l'incubation, sont immergés pendant 12 minutes (à l'aide d'un appareil

leur assurant un déplacement continuel dans le liquide) dans une solution d'hydroxyde de potassium à 1 p. 100. Après lavage à l'eau, ils sont traités d'une façon similaire et pendant 10 minutes dans une solution à 1 p. 100 de permanganate de potassium ; enfin, ils sont rincés une dernière fois dans l'eau courante (VAGO, 1954 a, 1954 b).

Dans tous les essais, nous avons cherché à rendre les chiffres obtenus compatibles avec l'évaluation biométrique, en tenant compte du groupement des individus et des lots. Ceci est tout particulièrement valable pour les systèmes d'isolements individuels. Nous avons essayé de définir, en vue de l'évaluation des observations, la signification des lots topographiquement répartis dans la pièce climatisée utilisée pour tous nos essais expérimentaux.

La première série de ces essais préliminaires tendait à définir les variations de température et d'humidité en divers points des claies d'élevage. Les mesures effectuées parallèlement avec psychromètres, hygro et thermomètres enregistreurs ont montré que les divers microclimats n'ont pas présenté entre eux de différence supérieure à 0,5°C. et à 5 p. 100 d'humidité relative.

D'autre part, nous avons également recherché l'établissement d'un test d'homogénéité à caractère biologique. Sur 16 lots, comprenant chacun 10 larves de *Bombyx mori*, répartis selon le principe des carrés latins, une infection virale à *Borrelina bombycis* a été effectuée avec une dose faible (environ 10 000 polyèdres par mm3) au cours d'un repas de durée limitée. L'évolution de la mortalité dans les divers lots n'a pas montré de différences significatives. Une infection par contact sur un point déterminé de la cuticule avec des spores de *Beauveria bassiana* n'a pas amené non plus de différences topographiquement significatives de la mycose en fonction de la vie larvaire.

Il ressort de ces essais préliminaires l'absence de variations systématiques en relation avec la répartition topographique des individus étudiés dans le local d'expérience. En conséquence, il nous a paru utile de présenter les résultats dans le cadre d'un lot pour l'ensemble des individus étudiés.

Enfin, toutes les micro et macrophotographies ont été réalisées par nous-même.

MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Il peut être groupé en trois catégories :

a) Les Insectes sur lesquels les observations de départ ont été effectuées dans la nature appartiennent aux groupes des Lépidoptères, des Coléoptères, des Orthoptères et des Diptères. Comme nous n'avons travaillé que sur les complexes d'enchaînement pouvant être reproduits

sur *Bombys mori*, ces Insectes n'ont pas été élevés continuellement, mais dans certains cas, et seulement maintenus pendant de courtes périodes.

b) Tous les travaux expérimentaux figurant dans cette note ont été effectués sur *Bombyx mori*. Ce « type biologique » a été choisi en raison des connaissances que nous avons sur sa physiologie et sa pathologie. De plus, il existe à l'heure actuelle, des méthodes d'élevage et d'expérimentation permettant une uniformité des travaux, difficilement réalisable avec d'autres Insectes. La race principale employée était la « Roustan 200-300 ». Lorsque certaines comparaisons ont été nécessaires, les races « Agniel », « Roustan Chinois doré » ou « Delmas soufré » furent élevées. Tous les essais dont les horaires, les modes d'alimentation ou le microclimat particulier ne seront pas précisés, s'appliquent à des éducations réalisées à 22° ± 0,5°C. avec humidité relative de 70 ± 5 p. 100 et 4 repas par jour à 7 heures, 12 heures, 16 heures et 21 heures.

c) Les microorganismes déterminés sur les cas spontanés et ceux employés pour l'étude expérimentale sur *Bombyx mori* ont tous été isolés au cours de nos travaux et ont été conservés en collection. Les cryptogames et bactéries sont passés alternativement sur milieux artificiels (mentionnés plus haut), et sur Insectes sensibles. Certaines souches comme *Pseudomonas septica* Bergey et *Bacterium paracoli* Gilb. et Lion ont été réactivées plusieurs fois sur *Bombyx mori* avant d'être utilisées expérimentalement sur ce dernier. Les Protozoaires du groupe des sporozoaires ont uniquement été maintenus par passages sur Insectes. Pour les virus, les corps d'inclusion ont été desséchés sous faible vide à 18°C. et gardés sous forme de comprimés ou ont été lyophilisés à —70°C. sous vide de 10^{-3}, 10^{-4} (Vago, Hauduroy, 1954). Ce matériel infectieux, avant d'être utilisé pour les expériences, a toujours été passé sur l'Insecte sensible.

Les souches microbiennes figurant dans l'ensemble de cette étude quoique variées en ce qui concerne les groupes de microorganismes, sont cependant limitées uniquement à des espèces entomophytes. Ainsi, pour les Cryptogames, toutes les espèces appartiennent aux *Deuteromycete* et concernent les genres *Beauveria, Metarrhizium, Fusarium, Rhizopus, Penicillium, Aspergillus et Scopulariopsis*. Pour les Protozoaires, le travail se limite au genre *Nosema* appartenant aux sporozoaires. Parmi les Bactéries, les sporogènes aérobies sont essentiellement représentés par les *cereus* cristallophores (*Thuringiensis*) et les non sporogènes par des *Enterobacteriaceae* comme *B. paracoli* et *Serratia* ainsi que par certaines souches entomophytes classées auparavant parmi les Streptocoques. Dans le domaine des Virus, les observations dans la nature concernent aussi bien les types nucléaires du genre *Borrelina* que les types cytoplasmiques du genre *Smithia*. Pour la partie expérimentale, nous avons utilisé seulement le virus *Borrelina bombycis*.

CHAPITRE II

HISTORIQUE

Dès les premiers travaux relatifs aux maladies des Insectes, (ce qui remonte à deux siècles) on trouve quelques observations mentionnant que certaines affections apparaissent souvent ensemble dans un même lot d'Insectes. Ainsi, au cours d'élevages de Vers à Soie, ROBINET (1848) et GOURDON (1852) remarquent fréquemment l'apparition de « vers courts » après une affection qu'ils appellent « clairette » et qui correspondrait à la « gattine » actuelle. De même d'après PASTEUR (1870) les élevages du même Insecte étaient simultanément atteints de pébrine et de flacherie à l'époque du fléau mondial. Ces remarques n'envisagent cependant aucune relation entre les maladies. Des observations écologiques plus récentes mentionnent que certaines infections s'installent plus rapidement sur une cuticule lésée ou fragile (SNOW, 1986 ; NORTHRUP, 1914 a, b ; STUTZER, WSOROW, 1927 ; TAUBER, 1940). Il s'agit là de cas isolés apparus spontanément et non suivis d'observations répétées ou d'expériences.

De plus amples renseignements, surtout d'ordre pratique, peuvent être extraits d'observations visant à la prophylaxie, telle l'apparition fréquente de nosémose à la suite de dysenteries amibiennes affaiblissant les abeilles (BORCHERT, 1930 ; MORGENTHALER, 1939). Le caractère de ces observations reste toujours écologique. Cependant, TOUMANOFF dans son traité sur les maladies des abeilles (1951) présente la question comme « l'une des plus intéressantes de la pathologie apicole ». PAILLOT (1942) signale également l'apparition d'une flore microbienne intestinale chez le Ver à Soie, après l'action du virus attaquant l'épithélium du tube digestif. Il est difficile toutefois d'interpréter ces remarques car le virus en question n'a pu être mis en évidence et son rôle n'a pas été confirmé par les nombreux bacologues italiens qui ont étudié cette question.

Notons aussi les nombreuses remarques, formulées en pathologie des Insectes ainsi que dans les autres domaines de la pathologie, et faisant allusion à un « affaiblissement » chaque fois que l'apparition d'une maladie n'a pu être expliquée. Parmi les facteurs multiples évoqués, il y en a certainement qui sont de véritables maladies. Ce point cependant n'a pas été développé bien qu'il s'agisse de problèmes souvent économiquement intéressants comme la loque européenne de l'abeille, la flacherie du Ver à Soie ou les épizooties de viroses apparaissant dans la nature (VERSON, 1869, 1891 ; WAHL, 1912 ; WHITE, 1920, TEODORO, 1928 ; BURNSIDE, 1934 ; COLLIER, 1934).

C'est à partir de telles remarques et d'observations semblables

faites par nous-même, que nous avons envisagé l'étude expérimentale des rapports entre maladies et précisé ensuite les *liens d'enchaînement.* Pour développer une telle conception il ne nous a pas été possible de trouver des données dans les ouvrages traitant des phénomènes pathologiques chez les Insectes d'une façon synthétique, travaux dans lesquels une telle notion aurait dû pourtant apparaître (Paillot, 1933 ; Masera, 1936 ; Huff, 1940 ; Toumanoff, 1949, 1951 ; Steinhaus, 1949 b, 1954 ; Bergold, 1953). Steinhaus, dans les deux ouvrages successifs (1947, 1949 b) consacrés entièrement à la mise au point de l'état actuel des principes de base en pathologie des Insectes, ne mentionne pas une telle unité bien qu'un grand nombre de ses chapitres traite comparativement l'ensemble des études entomopathologiques. Ainsi, à l'heure actuelle, il n'a pas été envisagé en entomopathologie de considérer d'une manière comparée et analytique les phénomènes pathologiques en tant qu'enchaînements de maladies avec la mise en évidence expérimentale de l'existence et du mécanisme de tels rapports.

Chapitre III

COMPLEXE OLIGO-INFECTION BACTÉRIENNE-FLACHERIE

ORIGINE DE LA MISE EN ÉVIDENCE DU COMPLEXE PROBLÈMES ÉTIOLOGIQUES RELATIFS A LA FLACHERIE DU VER A SOIE

L'une des maladies parmi les plus généralisées et économiquement les plus importantes du Ver à Soie, la « flacherie » est restée sur plusieurs points inexpliquée malgré les recherches effectuées dans les pays séricicoles asiatiques et européens. En une centaine d'années, de nombreuses hypothèses ont été émises sur son étiologie. L'antagonisme des opinions était peu prononcé avant 1860 (Nysten, 1808 ; Bonafous, 1840 ; Robinet, 1848 ; Charrel, 1848 ; Gourdon, 1852 ; Roux, De Gravillon, 1857) il s'est affirmé à la suite des travaux de Pasteur (1868, 1869) en France et de Verson (1869, 1871, 1872, 1906) en Italie, et s'est accentué pour devenir aigu lors des controverses entre Paillot (1926 a, b, 1927 b, 1931, 1934 b, 1935) et Acqua (1927 a, 1928, 1932).

A l'époque de ces derniers, les confusions augmentèrent dans de telles proportions que les divers auteurs en vinrent à ne plus pouvoir établir de correspondance entre les cas de flacherie étudiés par eux.

Au cours des années 1949 et 1950, nous avons insisté (Vago, 1951 a) sur le fait que la « flacherie » ne serait qu'une entité symptomatologique

et nous avons axé nos recherches essentiellement sur la mise en évidence des unités étiologiques. Afin de pouvoir sortir de l'impasse des confusions au sujet de la correspondance des diverses maladies étudiées, nous nous sommes bornés uniquement à l'examen détaillé des cas de flacherie des régions séricicoles de France.

Grâce à environ 2 000 envois de Vers à Soie atteints de flacherie, provenant des départements du Gard, de l'Ardèche, de la Lozère, de l'Hérault et de la Drôme, nous avons pu définir à partir de 1950, plusieurs types étiologiques :

— un type infectieux dû à une souche de *Bacillus cereus* (Vago, 1951 a),

— un type physiologique ayant un rapport avec l'asphyxie partielle,

— une flacherie consécutive aux troubles alimentaires.

Dans le cadre de ces travaux, un type de « flacherie » nous a particulièrement fait hésiter à cause de l'impossibilité d'obtenir un ensemble pathologique permettant de classer la maladie dans l'un des types. Les échantillons atteints de cette affection présentaient en plus de tous les symptômes de relâchement musculaire, de paralysie et de liquéfaction rapide, signes classiques des flacheries, une atrophie plus ou moins prononcée et une teinte légèrement jaunâtre comparable à celle des Vers venant de sortir de mue. Ces symptômes pouvaient la faire assimiler au type connu par les sériciculteurs sous la dénomination de « gattine » ou « harpion ».

La maladie apparaissait d'une façon irrégulière dans presque toutes les régions séricicoles de France mais avec une nette concentration dans les parties montagneuses de la basse Ardèche et dans les Cévennes gardoises.

A l'autopsie, on constate une réduction du tissu adipeux et une atrophie des glandes séricigènes. C'est le tube digestif qui présente le plus d'altérations. Même après les repas, il est moins rempli de feuilles que chez les Vers sains, ce qui dénote une alimentation réduite. Le contenu intestinal ne subit pas dans l'intestin postérieur une déshydratation normale. Ceci se traduit souvent par une forme ovoïde inhabituelle des crottes avec signes de diarrhée. Le degré de cette dernière peut varier du simple ramollissement à la liquéfaction.

A l'examen microscopique (coloration May-Grünwald-Giemsa, Lœffler, Gram), l'hémolymphe ne présente aucune altération typique ; elle est exempte de germes et d'éléments phagocytes. Les seules anomalies observables consistent en une légère vacuolisation des micro et quelquefois des macronucléocytes avec groupement fréquent des deux types en amas.

Ce n'est que dans quelques exemplaires mourants ou morts que l'on observe une septicémie due à un streptocoque dont nous parlerons plus loin.

La flore microbienne du tube digestif est plus riche que celle des

larves saines. Cette richesse ne provient pas de l'augmentation du nombre des espèces, mais de celle des éléments des espèces habituelles. Nous retrouvons le *Micrococcus pyogenes albus* Mig,. comme chez l'Insecte sain, ainsi qu'une autre espèce de *Micrococcus* douée d'un pouvoir protéolytique marqué. Cette dernière espèce a également pu être isolée à plusieurs reprises de l'intestin moyen des larves saines. Une autre bactérie normale dans le tube digestif, le *Streptococcus bombycis* Flugge L. (1), montre dans cette maladie une augmentation nette du nombre d'éléments. Chez certains individus, le contenu intestinal est rempli de ces coccis. Enfin, parmi les sporogènes rares dans le tube digestif sain, nous trouvons ici dans 6 p. 100 des cas examinés, des formes pouvant être considérées comme *Bacillus megatherium* De Bary. Ces dernières, administrées « per os » et à forte dose, se sont montrées (environ 10 000 000 germes par cm^3) dépourvues de toute virulence vis-à-vis des larves de *Bombyx mori*. Enfin nous avons isolé à plusieurs reprises un *Bacillus* expérimentalement très pathogène par voie buccale et semblant morphologiquement et par sa pathogénèse à fortes doses, identique à *Bacillus cereus alesti*, agent pathogène d'une flacherie que nous avons étudiée (Vago, 1951 a ; Toumanoff et Vago, 1951). Soulignons cependant que le nombre des élé-

Tableau I

Comparaison de la richesse en streptocoques de l'intestin moyen chez les larves saines et atrophiées

Provenance	Nombre de coccis par mm^3 de contenu de l'intestin moyen postérieur (sur 10 vers du début 5e âge)		
	Inférieur à 100	Entre 100 et 10 000	Supérieur à 10 000
Saint-Jean-du-Gard, sains	10	0	0
Mialet (Gard), sains	9	1	0
Mialet (Gard), atteints	1	3	6
Lasalle (Gard), sains	9	1	0
Lasalle *a* (Gard), atteints	0	5	5
Lasalle *b* (Gard), atteints	0	0	10
Saumane (Gard), atteints	0	1	9
L'Estrechure (Gard)	1	5	4
Valleraugue (Gard), sains	10	0	0
Alès (Gard), sains	10	0	0
Saint-Christol-les-Alès (Gard), sains	9	1	0
Ruoms (Ardèche), sains	10	0	0
Labeaume (Ardèche), atteints	0	6	4
Saint-Étienne-Vallée-Française (Lozère), sains	10	0	0
Saint-Étienne-Vallée-Française (Lozère), atteints	1	5	3
Uzer (Ardèche), atteints	0	4	6
Joyeuse (Ardèche), atteints	1	4	5

(1) Le classement initial parmi les Streptocoques du *Streptococcus bombycis* Flugge a été remanié par Cappellato (1947). D'après cet auteur, les souches isolées au cours de plusieurs épizooties montrent les caractéristiques biochimiques des Enterococcus. Le classement dans les espèces rencontre plus de difficultés car certaines souches se rapprochent davantage du type *faecalis* et d'autres du *liquefaciens*.

ments de cette bactérie est très restreint et constitué de formes végétatives.

Grâce à l'histopathologie, nous avons pu obtenir des renseignements concernant surtout les processus intestinaux. En effet, ni dans les celulles épithéliales, ni dans le tissu adipeux, nous n'avons pu déceler de différences morphologiques notables vis-à-vis de l'Insecte sain. Le seul phénomène est l'atrophie du tissu adipeux signalée plus haut.

La muqueuse de l'intestin moyen voit s'effacer les contours de ses cellules vers la lumière intestinale, ce qui dénote un début de lyse. Sur certains points de la partie antérieure de l'intestin moyen, les cellules ainsi altérées se trouvent groupées, montrant une surface étendue de lésions. En contact avec les cellules intestinales, on retrouve de nombreux coccis souvent en diplococcis. On ne peut se prononcer sur une nette accumulation de ces germes autour des cellules, mais aux endroits lysés ils sont toujours présents en plus grand nombre.

Dans la lumière intestinale on trouve beaucoup de cellules épithéliales détachées, ou des débris cellulaires, ce qui ne se rencontre pas ou très peu chez les larves saines.

L'ensemble des observations montre que ces caractéristiques ne peuvent être assimilées au déroulement d'un processus pathologique connu chez cet Insecte. Par contre, en groupant les divers symptômes, nous pouvons retrouver des ensembles assez caractéristiques de certains types de pathogénèse.

Ainsi la multiplication du *Streptococcus bombycis*, la lyse partielle et le détachement des cellules intestinales, les signes de diarrhée, caractérisent une entérite typique des larves de *B. mori*, observable dans des conditions diverses. La mortalité rapide et importante pendant les « touffes » prouve une sensibilité des Vers vis-à-vis de cet état climatique. Les degrés de température, d'hygrométrie et la stagnation de l'air au cours des « touffes » donnant lieu à cette mortalité, étant beaucoup plus faibles que ceux nécessaires pour influencer l'état sanitaire des Vers normaux, nous en déduisons un affaiblissement et une sensibilité inhabituelle très prononcés.

D'autre part, l'atrophie tissulaire, la vacuolisation des micronucléocytes et la pycnose nucléaire traduisent une action toxique. Ceci nous amène à effectuer certains rapprochements avec la flacherie à *B. cereus alesti*, d'autant plus que ce microbe a été plusieurs fois isolé au cours de la maladie, et que ses foyers se trouvent toujours près de ceux de la flacherie bacillaire. Afin de pouvoir approfondir ce rapprochement, nous résumons les caractéristiques de cette affection :

Dans certaines régions séricicoles de France (notamment dans les Cévennes) nous avons suivi pendant 3 ans les épizooties de flacherie, montré l'existence d'un type infectieux et après examen de 226 souches

bactériennes, isolé l'agent pathogène sous forme d'une bactérie sporulée aérobie. Nous avons en même temps mis en évidence l'identité de la pathogénèse, des altérations intestinales, de la paralysie et des anomalies hématologiques chez la maladie reproduite expérimentalement, et chez la « flacherie » spontanée (VAGO, 1951 a).

La forme sporulée du bacille s'est montrée, au bout de trois années de conservation à l'état sec, à l'abri du soleil et à 22°C., aussi virulente que les souches récemment isolées. Les prospections épizootiologiques dans de nombreux « mas » cévenols pratiquant l'élevage des Vers à Soie depuis un siècle, ont permis de définir cette entité pathologique comme ayant une potentialité élevée de persistance endémique. Elles ont permis de reconnaître dans celle-ci, les lignées ininterrompues de l'ancien fléau étudié par PASTEUR dans ces mêmes endroits (VAGO, 1951 a).

Parallèlement, la souche isolée a été étudiée bactériologiquement en collaboration avec le Service du Professeur C. TOUMANOFF de l'Institut Pasteur, et le germe a été classé comme une variété « *alesti* » du *Bacillus cereus* (TOUMANOFF, VAGO, 1951). L'action sur jaune d'œuf a été soulignée (TOUMANOFF, 1954) comme signe distinctif vis-à-vis d'autres souches du groupe *Thuringiensis* (pourvues de cristaux intracellulaires) des *cereus*. Ces travaux ont été continués par la recherche de la nature de l'effet toxémique du bacille, c'est-à-dire l'action foudroyante d'une quantité importante de germes ingérés. En même temps, en collaboration (DRILHON, VAGO, 1953), l'effet lytique de cette toxémie rapide sur les acides aminés de l'hémolymphe, a été défini.

Cette paralysie subite et spectaculaire, les signes typiques de toxémie et l'aspect « vivant » des Vers morts (pas de changements externes par rapport aux vivants) après administration de doses fortes de *Bacillus cereus alesti*, ne permettent pas d'établir de liaisons avec l'affection décrite plus haut.

Par des expériences effectuées avec des doses minimes, nous avons pu montrer que l'effet du même microbe joue un rôle dans la genèse de cette affection et que cette dernière constitue un complexe de succession d'affections.

OBTENTION D'EFFETS SUBLÉTHAUX PROLONGÉS AVEC BACILLUS CEREUS ALESTI

Les observations relatées ci-dessus, ont mis en évidence une maladie typique et chronique représentant plutôt un « état » qu'une affection en voie d'évolution. En effet, au cours d'une pathogénèse rapide, la plus grande partie des altérations tissulaires notamment l'atrophie prononcée, n'aurait pas pu se développer. Il a donc fallu en premier lieu voir si une infection par voie buccale avec *Bacillus cereus alesti* pouvait déterminer

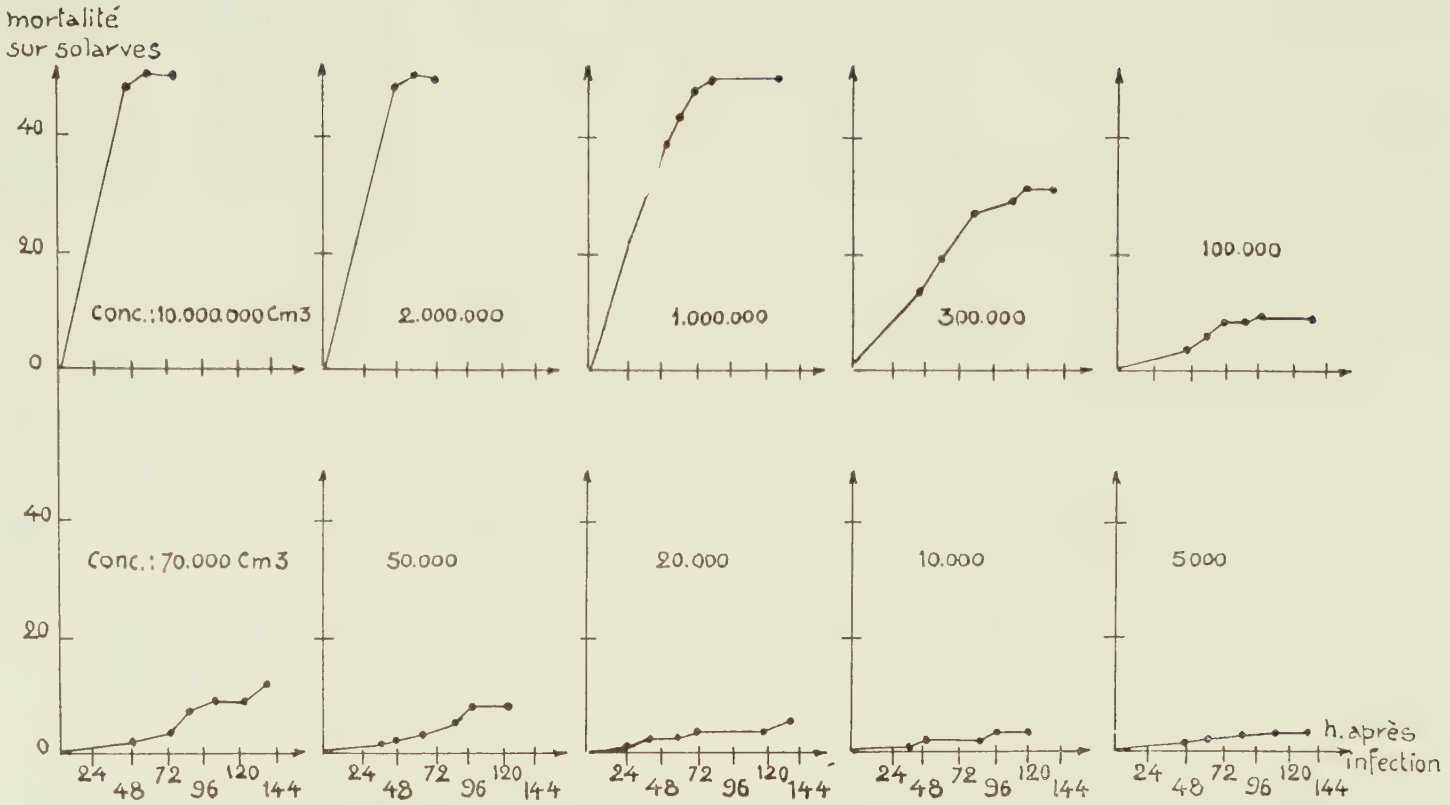


FIG. 1. — Effets comparatifs de *B. c. alesti* « per os » vis-à-vis des larves (3e âge) de *Bombyx mori* L. en fonction de la concentration de la matière virulente (voir explications dans le texte).

une affection ralentie à caractère chronique. Pour cela, nous avons réalisé des essais d'infection avec doses décroissantes de germes actifs :

Nous nous sommes basés sur une dose, définie antérieurement grâce à des séries d'essais d'infection, entraînant la toxémie foudroyante au bout de cinq heures au maximum. Cette quantité correspond au nombre de germes ingérés par un Ver à Soie dans les conditions suivantes :

— âge du Ver : troisième,

— repas infectant : au moins 24 heures après la sortie de deuxième mue et 24 heures avant l'entrée en troisième,

— jeûne pendant 10 heures (premier repas de la journée),

— trempage des feuilles de mûrier pendant 5 minutes,

— suspension infectante : 50 000 000 d'éléments de colonie de *B. cereus alesti* par cm^3 physiologique,

— âge de la culture bactérienne : 48 heures à 30°C.

C'est dans ces conditions, qu'ont été infectés pour chaque cas, 10 lots de 50 larves chacun, avec les doses dégressives suivantes :

a) 10 000 000 d'éléments bactériens environ par cm^3 de suspension.
b) 2 000 000 d'éléments bactériens environ par cm^3 de suspension.
c) 1 000 000 d'éléments bactériens environ par cm^3 de suspension.
d) 300 000 éléments bactériens environ par cm^3 de suspension.
e) 100 000 éléments bactériens environ par cm^3 de suspension.
f) 70 000 éléments bactériens environ par cm^3 de suspension.
g) 50 000 éléments bactériens environ par cm^3 de suspension.
h) 20 000 éléments bactériens environ par cm^3 de suspension.
i) 10 000 éléments bactériens environ par cm^3 de suspension.
j) 5 000 éléments bactériens environ par cm^3 de suspension.

La figure n° 1 montre que les doses fortes agissent d'une façon uniforme avec peu de variations. Plus la quantité de microbes ingérés devient faible, plus les différences individuelles jouent et créent des variations de sensibilité assez importantes. Enfin, dans les doses très faibles la mortalité immédiate est pratiquement supprimée. Nous pouvons considérer que dans les conditions de cet essai, la plus forte concentration, environ 1 000 000 d'éléments par cm^3, détermine surtout la toxémie aiguë. Une concentration diminuant jusqu'à environ 100 000 éléments par cm^3, peut causer soit des toxisepticémies aiguës, soit des intoxications plus lentes. Au-dessous de 50 000 éléments par cm^3, il n'y a plus d'effet aigu.

Des essais faits dans d'autres conditions, au point de vue âge et race des chenilles, date des mues, durée du jeûne, qualité de la feuille de mûrier, température et humidité, ont montré que la limitation de ces effets subit des variations. Ces facteurs jouent en effet un rôle sur la quantité de nourriture ingérée, mais le principe de changement d'action

entre maladie aiguë et masquée, en rapport avec la quantité de germes absorbés reste valable.

Nous avons ainsi considéré que 5 000 éléments environ par cm^3 constituent la dose infectante pour l'examen des effets d'une infection subléthale à *B. c. alesti*.

ÉVOLUTION DU PROCESSUS PATHOLOGIQUE VERS LE SYNDROME DE LA FLACHERIE

La dose infectante de *B. c. alesti* n'entraînant aucune action pathologique immédiate étant déterminée, il nous a été possible de suivre

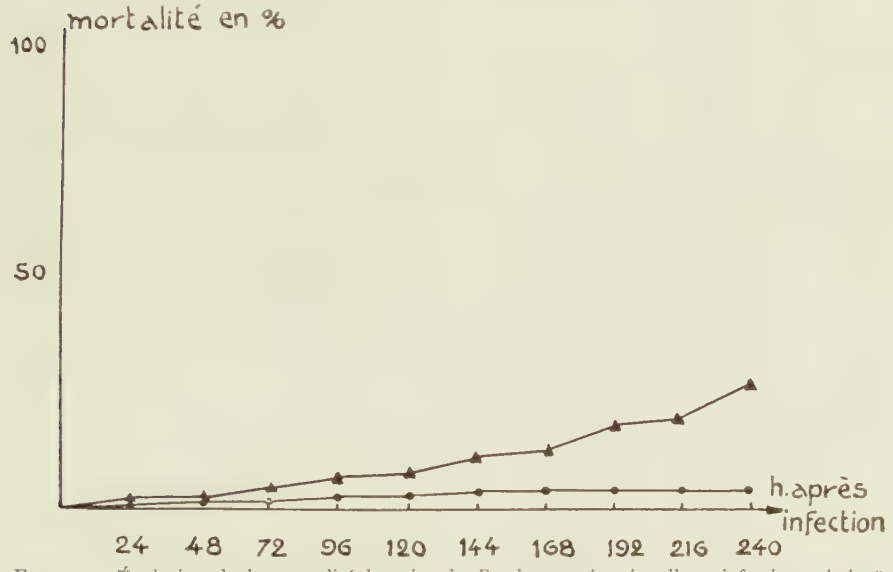


FIG. 2. — Évolution de la mortalité larvaire de *Bombyx mori*, suite d'une infection subaiguë à *B. c. alesti* lots de 1 000 larves de 3e âge). ▲ Lot traité ; ● lot témoin.

progressivement dans des conditions expérimentales les éventuels effets tardifs d'une infection atténuée.

Ces recherches ont été effectuées (afin de rendre contrôlables tous les facteurs autres que l'infection) dans une chambre climatisée maintenant une température de 22 ± 05°C. et une humidité de 70 ± 5 p. 100 avec renouvellement total de l'air de la pièce (20 m^3) toutes les 20 minutes.

Les Vers à Soie en expérimentation appartenaient à la race Roustan 200-300. Ils avaient franchi la deuxième mue depuis 24 heures et ont été alimentés quatre fois par jour.

L'essai principal comprenait des lots de 1 000 individus pour la série infectée et autant pour la série témoin, répartis selon un schéma

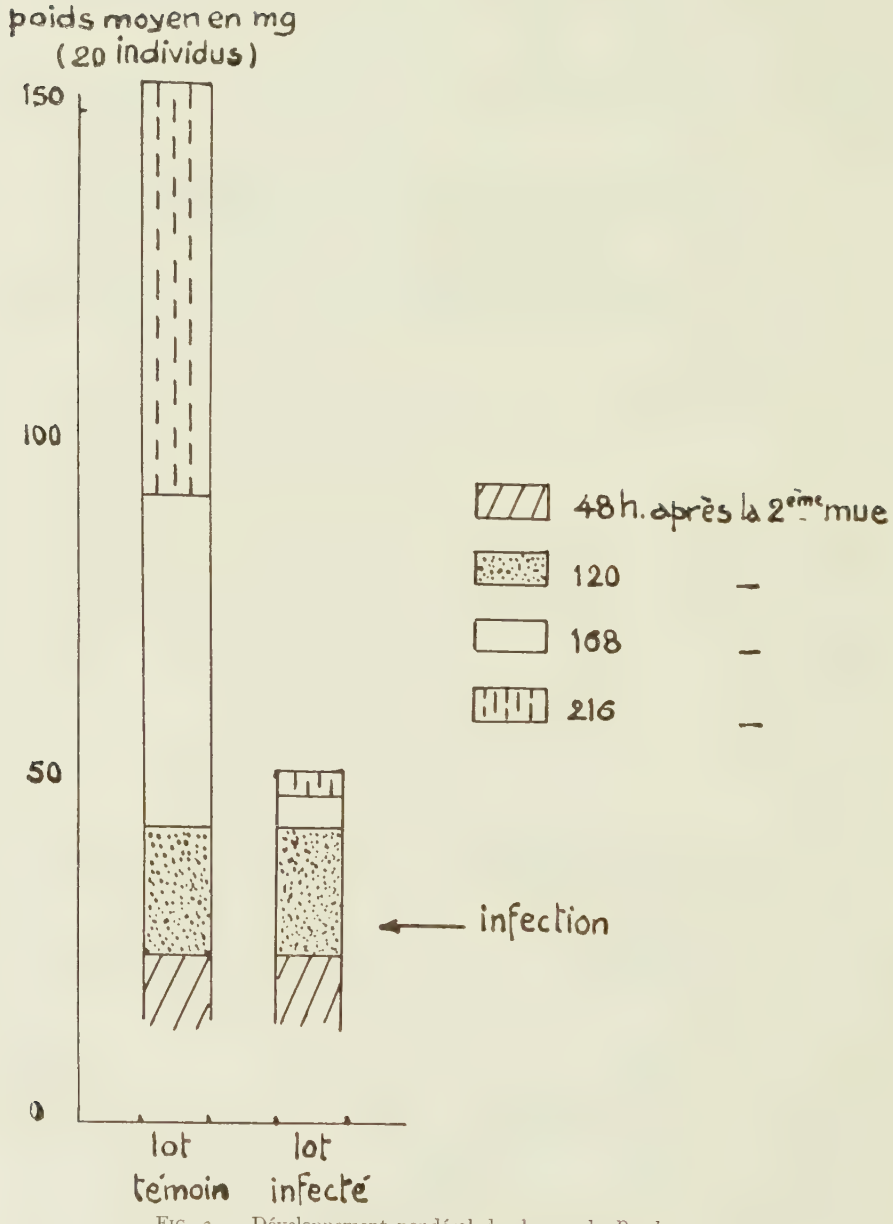


FIG. 3 — Développement pondéral des larves de *Bombyx mori*, suite d'une infection subaiguë à *B. c. alesti*.

préalablement contrôlé en vue d'obtenir une homogénéité systématique (voir techniques).

L'infection a eu lieu au cours d'un repas avec une dose de 5 000 germes par cm³ de suspension. Les feuilles ont été traitées de la manière

exposée dans le chapitre « méthodes ». Les lots témoins ont reçu des feuilles trempées dans l'eau pendant un temps égal à celui du traitement infectant.

Les observations journalières ont montré l'évolution de cette infection très faible vers un syndrome. Nous traiterons analytiquement les éléments contribuant à la progression de l'état pathologique.

a) Augmentation de la mortalité larvaire.

D'après les relevés des deux observations journalières effectuées, consignés dans la figure n° 2, il n'y a pas d'effet mortel immédiatement après l'infection, mais seulement une mortalité très faible, avec symptômes

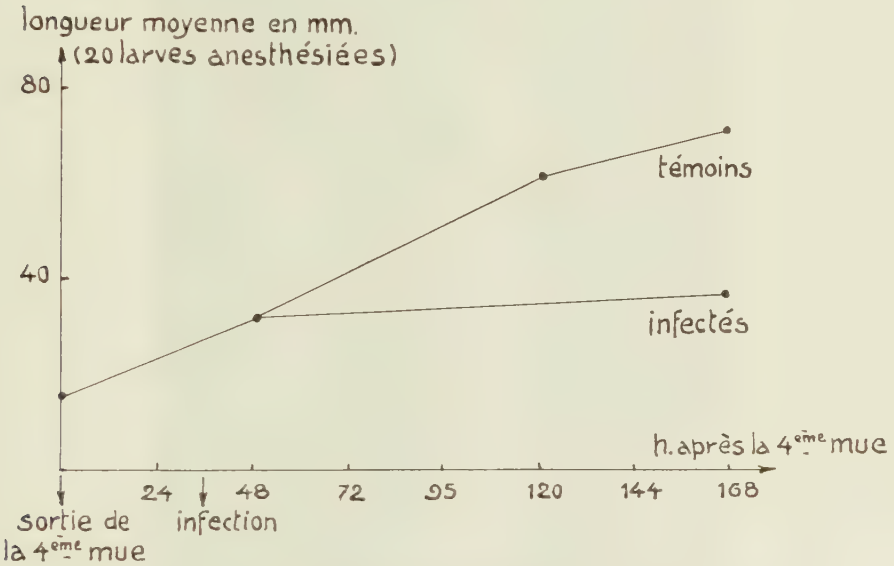


FIG. 4. — Effet de l'infection subaiguë à *B. c. alesti* sur la croissance linéaire des larves de *B. mori*.

typiques d'intoxication, accompagnée de septicémie. Cet effet se stabilise par la suite et va même en diminuant. Cependant au bout de 3 jours la mortalité augmente progressivement, mais cette fois les larves ne présentent ni les symptômes d'une toxémie, ni ceux d'une dysenterie chronique. L'aspect extérieur des Vers n'a rien de commun non plus avec celui des Vers atteints de toxémie. Ils sont plutôt raccourcis et ont une teinte jaunâtre. Ainsi les effets morbides et mortels consécutifs à l'infection très faible changent progressivement de caractère. Le type dysentérique apparaît tardivement et remplace insensiblement le premier. Cette image est celle d'un complexe subissant une période non caractéristique, évoluant vers une entité morbide nouvelle de plus en plus précise et homogène.

b) Atrophie progressive.

Comme nous venons de l'indiquer, les Vers morts peu après l'infection ont l'aspect habituel de la toxémie rapide due à *B. c. alesti*. Ils conservent la couleur, la taille et le poids des Vers sains.

Les survivants à l'infection faible, conservent également cet aspect quelque temps et aucun signe ne laisse supposer un état pathologique.

FIG. 5. — Larve de *B. mori* saine (5e âge) (gauche)
et larve de même âge ayant subi 5 jours plus tôt une oligo-infection *B. C. alesti* (droite).

Les mensurations et les pesées ne révèlent pas de différence vis-à-vis des lots témoins pendant les deux jours qui suivent l'infection.

Par contre, elles mettent en évidence à partir du troisième jour, une différence croissante vis-à-vis des témoins. Comme le montre la figure nº 3, celle-ci s'accentue rapidement. En effet, au moment où les larves témoins pèsent en moyenne 93 mg, les larves traitées cinq jours auparavant, n'atteignent qu'une moyenne de 49 mg. Au bout de 7 jours, les Vers infectés se maintiennent à 50 mg alors que les Vers normaux ont déjà dépassé 150 mg.

b) Atrophie progressive.

Comme nous venons de l'indiquer, les Vers morts peu après l'infection ont l'aspect habituel de la toxémie rapide due à *B. c. alesti*. Ils conservent la couleur, la taille et le poids des Vers sains.

Les survivants à l'infection faible, conservent également cet aspect quelque temps et aucun signe ne laisse supposer un état pathologique.

Fig. 5. — Larve de *B. mori* saine (5e âge) (gauche)
et larve de même âge ayant subi 5 jours plus tôt une oligo-infection *B. C. alesti* (droite).

Les mensurations et les pesées ne révèlent pas de différence vis-à-vis des lots témoins pendant les deux jours qui suivent l'infection.

Par contre, elles mettent en évidence à partir du troisième jour, une différence croissante vis-à-vis des témoins. Comme le montre la figure nº 3, celle-ci s'accentue rapidement. En effet, au moment où les larves témoins pèsent en moyenne 93 mg, les larves traitées cinq jours auparavant, n'atteignent qu'une moyenne de 49 mg. Au bout de 7 jours, les Vers infectés se maintiennent à 50 mg alors que les Vers normaux ont déjà dépassé 150 mg.

Ces chiffres attestent une évolution morbide particulièrement marquée : ralentissement du développement pondéral équivalent à un arrêt.

Les mensurations répètent les données pondérales. En effet, après 7 jours d'infection, nous relevons sur la figure n° 4 que dans une expérience d'infection à dose faible sur des larves au début du cinquième âge, la moyenne de longueur, 4 jours après l'infection, est de 35 mm. Les témoins ont une moyenne de 62 mm. Six jours après l'infection les larves traitées ont 38 mm alors que les saines dépassent 70 mm.

La figure n° 5 fait ressortir ces différences, les deux larves présentées montrent peu de ressemblance malgré l'identité d'âge et de conditions d'élevage.

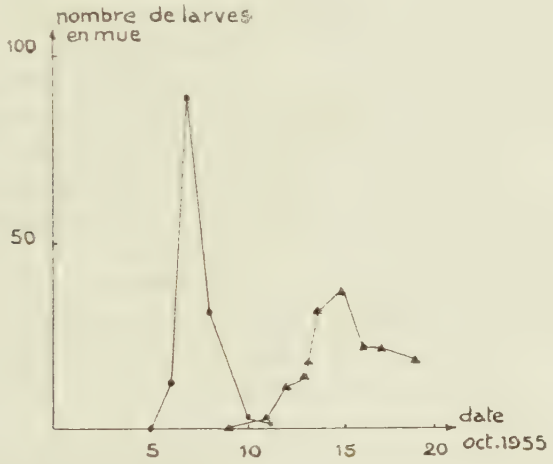


FIG. 6. — Modifications dans le déclenchement et dans la durée de la 4e mue chez *B. mori*, suite d'une infection subaiguë à *B. c. alesti*. (Lots de 1 000 larves). ● Larves infectées ; ▲ larves saines.

Notons un détail particulier lié à ces anomalies de développement et concernant la croissance de la tête. Des mensurations effectuées sur la tête après l'infection, montrent que le développement de cette partie du corps n'est pas en rapport avec les autres données. En effet, la progression de l'atrophie importante, pour le corps entier ne semble pas influencer le développement de la tête et après la mue suivant l'infection, les dimensions de cette dernière sont pratiquement identiques chez les Vers atrophiés et chez les témoins. Même sur les photographies (fig. n° 6) cette différence est nette : les deux Vers si dissemblables au point de vue taille ont des têtes morphologiquement identiques. Ces constatations peuvent être rapprochées de celles que FRAISSE (1953) a effectuées dans un but non pathologique.

c) Dérèglement des crises de développement (mues).

L'infection à dose faible avec *B. c. alesti* a été réalisée dans l'une

des séries expérimentales, peu après la troisième mue afin que l'effet tardif de cette affection se situe vers la fin du quatrième âge. Dans ces lots une nette influence sur la mue a pu être observée. En effet, comme ceci ressort de la figure n° 6, l'entrée en quatrième mue se produit normalement (lot a) et presque simultanément pour tous les individus du lot témoin, tandis qu'elle n'arrive que progressivement et irrégulièrement chez ceux du lot traité (b). De plus, le moment de la crise de mue est décalé dans le temps, et le retard est important malgré la rigoureuse identité des conditions d'élevage pour les deux catégories. Enfin, l'infection inapparente s'extériorise également par une mortalité accrue due aux troubles de mue.

L'ensemble de ces phénomènes caractérise un syndrome étroitement lié à l'atrophie généralisée décrite plus haut.

d) Troubles digestifs.

Afin d'évaluer l'effet de l'infection subaiguë sur le fonctionnement de l'appareil digestif, nous avons comparé d'abord la consistance et la composition morphologique du contenu intestinal et de l'épithélium intestinal sur quatre points du tube digestif : dans l'intestin antérieur, au début et à la partie postérieure du méso-intestin et dans l'intestin postérieur.

Pour obtenir des résultats comparables, nous avons effectué ces prélèvements toujours sur Vers vivants très affaiblis en prenant comme critère le stade où des difficultés de déplacement commencent à se manifester. Cette précision est indispensable car l'évolution de la flore intestinale peut être extrêmement rapide au moment de la mort, ce qui a déjà induit en erreur certains chercheurs en d'autres domaines de la pathologie du Ver à Soie.

Pour compléter nos observations, nous avons suivi, par examen direct de frottis et sur cultures, l'importance et la composition de la flore microbienne des mêmes prélèvements intestinaux car les changements sur ce point caractérisent d'une façon générale les affections intestinales chez les larves de Lépidoptères.

Immédiatement après l'ingestion du germe et même pendant les 3 ou 4 jours suivant celle-ci, nous ne constatons aucune différence importante entre l'intestin des Vers traités et celui des Vers sains. A partir du troisième jour, l'intestin est moins rempli que chez les témoins. Le rapport entre le suc secrété par les cellules intestinales et les feuilles ingérées, est légèrement changé au détriment des feuilles dont l'importance diminue. Ce phénomène s'accentue pendant les jours suivants avec réduction très nette de l'alimentation. La figue n° 7 illustre cette diminution en montrant la différence entre les quantités de feuilles ingérées pendant le même laps de temps par le même nombre de Vers sains et de Vers infectés 4 jours auparavant. (Les chiffres ont été obtenus grâce à des pesées de feuilles toutes les 30 minutes au cours du repas).

La déshydratation de l'aliment devient de plus en plus incomplète à partir du quatrième jour et dans le méso-intestin postérieur l'ensemble des fragments de feuilles en voie de digestion n'a plus la consistance compacte habituelle et ne durcit plus dans l'intestin postérieur. A partir de ce moment et d'une façon irrégulière, des signes de diarrhée commencent à se manifester chez certains Vers et leur proportion va en augmentant.

Les examens concernant la flore intestinale sont étroitement liés aux précédents et effectués sur les mêmes prélèvements que ceux-ci. L'examen direct des Vers sains ne permet d'apercevoir que rarement quelques Streptocoques (ne dépassant pas 1 à 2 éléments par champ

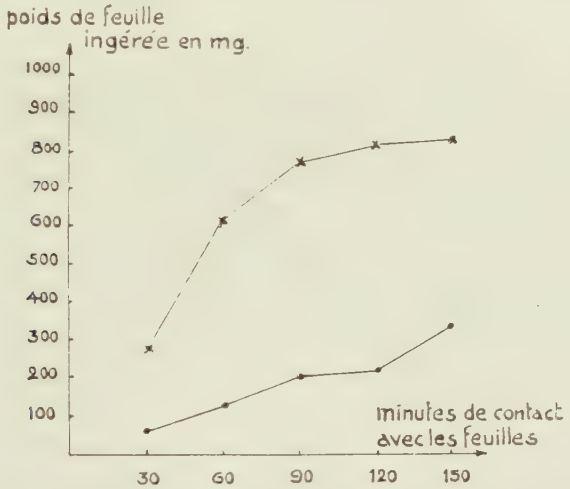


FIG. 7. — Courbes cumulatives des quantités de feuilles ingérées par 20 larves de *Bombyx mori* (4e âge). × larves saines ● larves 120 heures après oligo-infection à *B. c. alesti*.

microscopique) dans la partie antérieure du méso-intestin ou dans l'intestin postérieur. Par isolement on obtient des souches appartenant surtout aux coccis qui ont été considérés par CAPPELLATO (1947) comme *Enterococcus*.

Vingt-quatre heures après l'ingestion des germes, quelques spores et formes végétatives bactériennes, aux dimensions identiques à celles de *B. c. alesti*, se retrouvent aussi bien dans la partie antérieure que dans la partie postérieure du méso-intestin. Les cultures obtenues à partir des mêmes prélèvements présentent toutes les caractéristiques morphologiques de la souche ingérée. La virulence de cette culture vis-à-vis du Ver à Soie est comparable à celle de *B. c alesti* et son ingestion reproduit les symptômes habituels de la maladie. Des Streptocoques sont présents en nombre comparable à celui que l'on rencontre d'ordinaire

chez les Vers sains. Ce nombre dans la partie postérieure du méso-intestin augmente par la suite ainsi qu'en témoignent les prélèvements effectués au bout de 5, 6 et 7 jours. A ce moment là d'ailleurs, certains Vers ne contiennent pas seulement le germe en question, mais présentent une flore intestinale riche aussi bien en coccis qu'en bactéries courtes de formes et avec coloration discontinue caractéristique aux *pseudomonas*.

Les variations dans la flore ne se traduisent pas seulement par l'inégalité du nombre de certains germes, mais également par la présence facultative de *B. c. alesti*. En effet, à l'examen direct, les formes végétatives ou les spores de ce germe ne se rencontrent pratiquement plus. La culture du contenu intestinal sur gélose nutritive ne donne naissance aux colonies de ce bacille qu'environ dans 20 p. 100 des isolements.

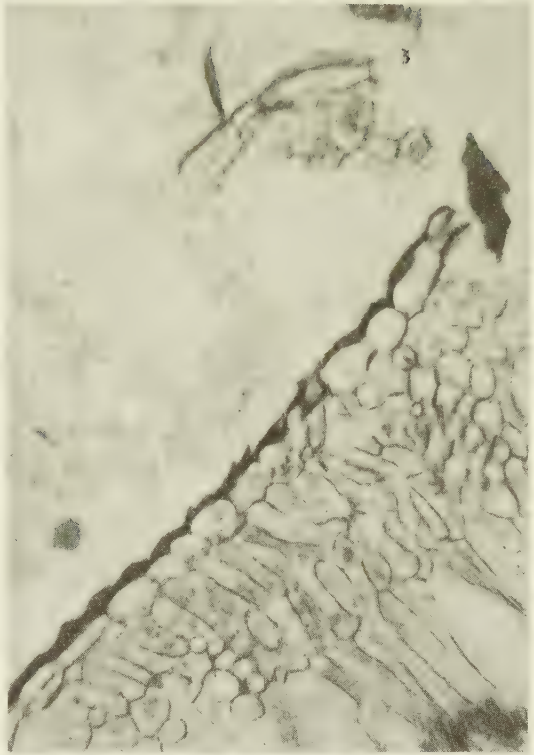
Au cours de l'évolution ultérieure de la maladie, l'abondance et la variété de la flore intestinale deviennent constantes. Les espèces isolées ont été déterminées comme : *Streptococcus bombycis* Flugge = *Enterococcus sp.* pour la grosse majorité et *Staphylococcus albus* et *sarcina* en faibles proportions.

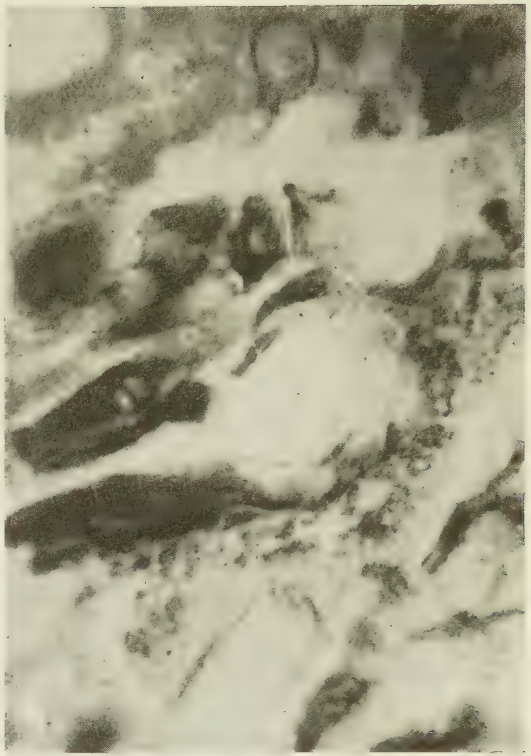
L'image de cette flore à un moment très éloigné de l'infection n'est en définitive ni comparable à la flore normale extrêmement pauvre en éléments, ni à celle suivant immédiatement l'infection faible qui est caractérisée par la même pauvreté et par la présence de rares formes végétatives et sporulées du germe ingéré. Cette nouvelle flore, tout à fait anormale chez *Bombyx mori*, atteste l'évolution progressive d'une affection intestinale (fig. nos 8, 9, 10).

e) Sensibilité thermique.

Un aspect particulier ressort d'une expérience consistant à soumettre les larves à une température de 30°C. pendant 6 heures. Ce traitement crée des conditions auxquelles les Vers à Soie sont souvent soumis au cours d'élevages normaux et qui sont habituellement suivies d'un état d'affaiblissement de certains individus. Nous avons envisagé de voir si les effets tardifs que nous étudions, réunissant déjà un certain nombre de signes des flacheries, ne présenteraient pas également cette particularité. Quatre lots de 1 000 larves sont constitués à la sortie de la deuxième mue. Deux sont infectés le troisième jour avec *B. c. alesti*. Cinq jours plus tard, un des lots non infectés et un des lots infectés sont soumis à une température de 30°C. pendant 6 heures puis sont remis en élevage à 20°C.

L'effet de ce traitement ressort de la figure n° 11. Une légère augmentation de mortalité est constatée dans le lot non infecté soumis au traitement thermique comparativement au lot non infecté et non traité. Dans le lot infecté et soumis à la chaleur, la mortalité accélérée déjà pendant la durée du traitement est supérieure à 50 p. 100 à la fin de celui-ci. Vingt-quatre heures plus tard, la totalité du lot a péri.





Syndrome de dysenterie chez *B. mori* (larves 5eme âge) 148 heures après oligo-infection à *B. c. alesti*.

FIG. 8. — Etat diarrhéique du méso-intestin; Atrophie.

FIG. 9. — Méso-intestin postérieur avec développement de *Streptococcus bombycis*. Hématoxyline ferrique. — Erythrosine 1 : 600.

FIG. 10. — Lésions épithéliales du méso-intestin avec infiltration du *Streptococcus bombycis*. Hemalun. — Erythrosine 1 : 600.

Cet essai met en évidence une particularité importante de l'évolution des effets tardifs, consistant en une sensibilité vis-à-vis de l'action de la chaleur de si courte durée soit-elle, et même si cette dernière n'est pas

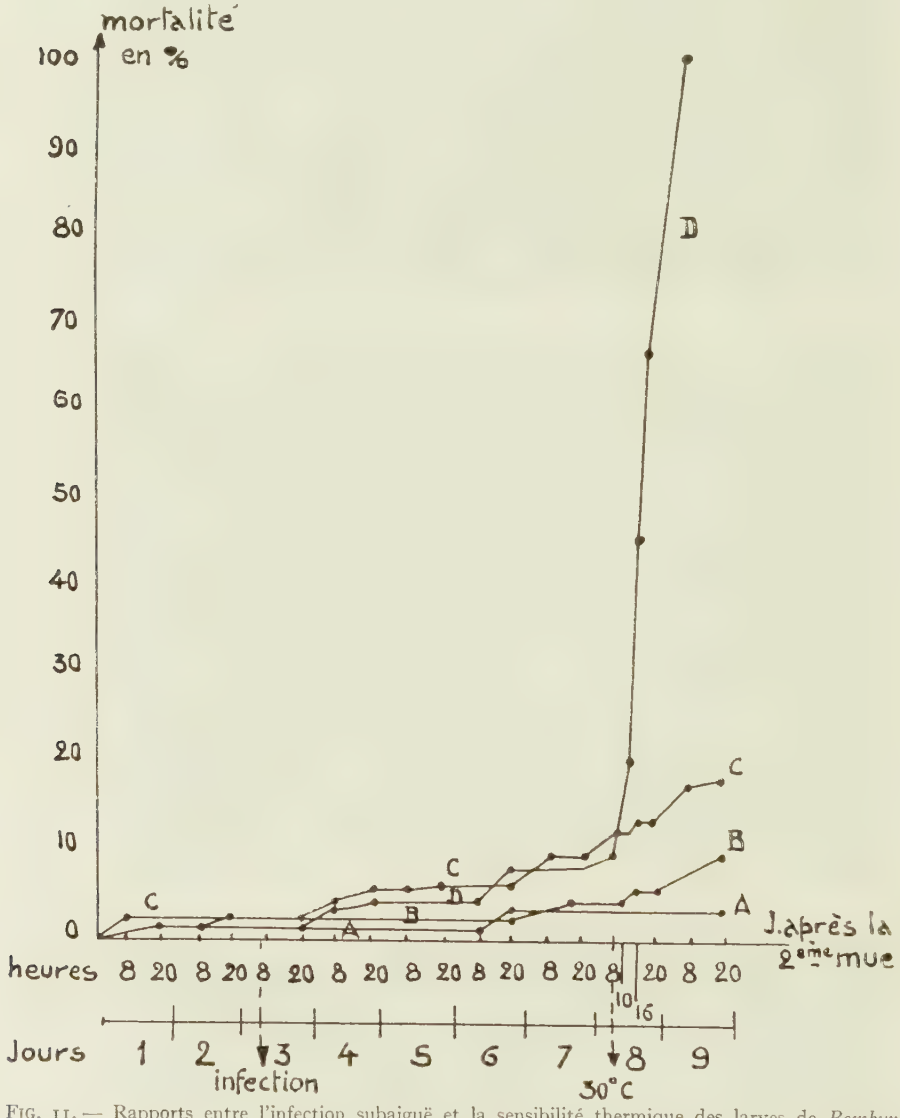


FIG. 11. — Rapports entre l'infection subaiguë et la sensibilité thermique des larves de *Bombyx mori* (3e âge). — Lot de 1 000 larves : A témoins, sans traitement thermique. B témoins, avec traitement thermique. C infecté, sans traitement thermique. D infecté, avec traitement thermique.

très élevée. Cette sensibilité n'a rien de comparable à celle des Vers sains chez qui un traitement identique est pratiquement sans action immédiate. Un enchaînement d'effets synergétiques particulièrement net apparaît ici rendant léthale une action peu nocive en elle-même.

HISTOPATHOLOGIE

Afin de pouvoir suivre les lésions tissulaires caractérisant l'évolution du complexe, des examens sur coupes histologiques ont été effectués à divers stades correspondant chacun à une étape symptômatologique précise.

Ainsi, 10 Vers (et autant de témoins) ont été fixés 6 heures, 28 heures, 4 jours, 7 jours et 10 jours après l'infection. Ces intervalles se rapportent au moment de l'infection, à la période sans symptômes externes et à divers stades de la différence pondérale, différences correspondant : au 1/4 du poid normal (environ 4 jours à 20°C.), aux 2/3 de celui-ci (environ 7 jours à 20°C.) et enfin à un stade encore plus avancé (voir : atrophie progressive, plus haut). En dehors de cette série, des larves sensibilisées par action de la chaleur ont également été examinées histologiquement 1 heure et 3 heures après l'effet thermique (voir : sensibilité thermique, plus haut). Pour les examens comparatifs, 3 catégories de témoins ont été constituées comprenant des Vers non traités soumis à l'action de la chaleur, des Vers infectés sans traitement thermique et enfin des Vers non infectés et ne subissant pas non plus de traitement thermique.

Contrairement à toutes prévisions, aucun effet immédiat n'est décelable histologiquement au cours des 48 premières heures suivant l'infection. Aucune forme végétative n'est visible dans la lumière intestinale même au contact des cellules épithéliales. En effet, ni l'examen des prélèvements directs de ces tissus, ni celui des coupes ne permettent d'observer une accumulation bactérienne. D'ailleurs, même le troisième jour après l'infection (stade correspondant déjà au début de l'inhibition de croissances linéaire et pondérale) ce n'est que dans des proportions faibles qu'une pénétration des bactéries à travers les cellules intestinales est observable et ceci dans le cas d'infections plus fortes. Ces bactéries dont le nombre est réduit, sont situées entre les cellules intestinales et la membrane péritrophique qui entoure ces dernières.

Au moment où l'inhibition atteint la différence de 1/3 entre le poids du Ver normal et celui du Ver infecté, le tissu adipeux est réduit à tel point que l'on ne peut plus distinguer de lobes isolés. De plus, l'ensemble des organes a diminué de diamètre proportionnellement. A ce stade, les cellules sanguines et surtout les macronucléocytes ont un cytoplasme particulièrement vacuolisé et la pycnose des noyaux est également à noter. Il y a lieu de comparer ces caractéristiques à celles qui ont été signalées chez les Vers infectés avec une dose forte de B. *c. alesti* (Toumanoff, Vago, 1953, a, b).

Au bout de 5 jours, quand l'atrophie est avancée, de faibles lésions apparaissent dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen. Elles ne concernent que la surface externe, c'est-à-dire celle en contact avec la

lumière intestinale. Elle consiste en la déchirure de la membrane péritrophique et surtout en l'accumulation des coccis à ce niveau. Le contenu intestinal mal digéré en contient également. On observe aussi des éléments cocciformes entre les cellules intestinales. Ceux-ci, souvent en amas s'infiltrent profondément à l'intérieur du tissu, le long des limites des cellules. L'intestin postérieur est anormal également parce qu'il renferme du liquide de secrétion mélangé à des débris de feuilles non digérés. Les Streptocoques se retrouvent ensuite dans l'ensemble du tube digestif. A un stade ultime de la maladie, le détachement des cellules épithéliales des intestins moyen et postérieur est à observer, ainsi que la désagrégation de la membrane basale. Dans certaines larves, des Streptocoques ou même des bactéries de formes diverses, peuvent être décelés entre les cellules intestinales ainsi qu'à proximité de la membrane basale et quelquefois même dans la cavité générale (fig. 10).

Nous avons porté une attention particulière aux larves soumises à l'effet de la chaleur car il était intéressant de suivre cet effet rapide attestant une sensibilisation. Histologiquement, pendant l'effet thermique il n'a été possible de mettre en évidence que peu de lésions tissulaires. Ensuite, notons le développement accéléré de la flore intestinale essentiellement constituée de Streptocoques. On voit des formes végétatives de *B. c. alesti* ce qui montre le maintien de cette bactérie pendant la maladie chronique. Il y a donc d'une façon générale, une activation rapide du développement bactérien ce qui s'explique d'ailleurs facilement par la connaissance des images histologiques précédentes. En effet, le terrain favorable à un tel développement était préparé par un aliment en voie de fermentation, par une flore préexistante groupant un nombre assez important d'éléments, par la présence d'une membrane basale discontinue et par l'existence de cellules épithéliales intestinales déjà attaquées. Parallèlement au développement de la flore, les altérations tissulaires évoluent rapidement et deux heures après l'effet thermique, la membrane basale est très détruite avec développement bactérien. La plupart des cellules intestinales sont déformées et vacuolisées et un grand nombre même est détaché. L'ensemble de ces symptômes histologiques montre que l'effet thermique agit, d'une part par une action directe s'expliquant par un processus d'asphyxie, d'autre part il entraîne des conséquences intestinales caractérisées par des lésions graves constituant en elles-mêmes un effet léthal.

ROLE DE LA TOXICITÉ BACTÉRIENNE

Dans le syndrome tardif suivant l'infection très faible à *B. c. alesti*, les études histopathologiques ont révélé plutôt des conséquences chroniques d'effets toxiques que celles de développement du germe.

Afin d'obtenir des précisions supplémentaires sur le mécanisme, nous avons suivi expérimentalement l'action d'une dose extrêmement faible de « cristaux intracellulaires » purifiés du germe, avec exclusion d'éléments vivants. En effet, d'après les travaux de Berliner (1915), Mattes (1927), Steinhaus et Jerrel (1954), Hannay (1953), Angus (1954), Fitz-James (voir Angus, 1954 b), Toumanoff et Vago (voir Toumanoff, 1955), Delaporte et Beguin (1955), la toxicité de plusieurs souches de *cereus* entomophytes est en relation étroite avec la présence de certaines inclusions cristallines. La formation de ces inclusions est peu connue à l'heure actuelle. Des travaux très récents de Toumanoff (1955 et inédits) sur *B. c. alesti* sont susceptibles d'apporter d'importantes données par la reproduction expérimentale de la formation des cristaux. La composition chimique de ces éléments est également à l'étude et grâce aux travaux (inédits) de Fitz-James toute une série de fractions protéiniques a été séparée des inclusions de *B. c. alesti*. Enfin, l'action physio-pathologique de chacune de ces protéines est approfondie expérimentalement (Fitz-James, Hannay, Toumanoff, Vago sous-presse).

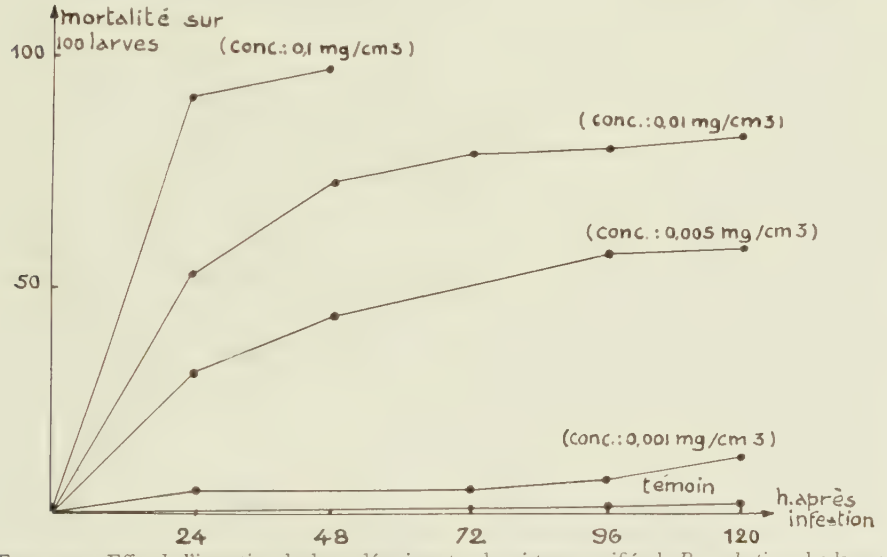


Fig. 12. — Effet de l'ingestion de doses décroissantes de cristaux purifiés de *B. c. alesti* sur les larves de *Bombyx mori* (4e âge).

C'est grâce à une suspension d'inclusions cristallines purifiées de *B. c. alesti*, préparée par le Dr. Fitz-James et aimablement mise à notre disposition par ce dernier et le Professeur Toumanoff, que nous avons pu réaliser des intoxications expérimentales à faibles doses.

Afin de faciliter l'établissement d'une éventuelle correspondance

entre l'effet des cristaux purifiés et la maladie spontanée, nous avons adopté la structure des expériences d'infections exposées plus haut.

Ainsi, nous avons d'abord déterminé par des essais simultanés, des doses d'inclusions toxiques amenant une affection ralentie. A cet effet, cinq lots de 100 larves (4e âge) chacun, reçoivent un repas de feuilles trempées dans des suspensions de cristaux à concentrations décroissantes précisées sur la figure 12. (La suspension est acceptée par les Vers, sans difficultés). On voit la transition entre une intoxication aiguë et des

Fig. 13. — Évolution de la mortalité larvaire après ingestion à dose faible d'inclusions purifiées de *B. c. alesti*.

affections peu prononcées. La ressemblance entre cette série de courbes et celles obtenues lors de l'infection bactérienne nous a permis de retenir la dose de 0, 001 mg/cm³ comme inductrice de l'effet très faible, recherché pour nos comparaisons.

Ensuite, comme pour les infections avec les cultures, nous avons suivi les conséquences de l'ingestion de la substance toxique avec analyse des éléments constituant l'évolution d'un syndrome.

a) Modifications relatives à la mortalité larvaire.

Contrairement à ce qui se passe avec des doses fortes, l'intoxication atténuée n'a pas d'effet immédiat marqué. L'ingestion des cristaux est suivie d'une mortalité journalière de 1 à 3 p. 100. Cependant en s'éloi-

gnant du moment du traitement les pertes deviennent plus importantes et progressivement la plus grande partie du lot s'élimine. Nous assistons ainsi à l'évolution d'une mortalité comparable par son allure, à celle définie lors de l'infection bactérienne subaiguë (fig. 13).

b) Conséquences vis-à-vis du développement larvaire.

Au cours des trois premiers jours suivant l'ingestion des cristaux, aucun changement externe n'apparaît sur les larves. A partir de ce moment là, les Vers traités commencent à se distinguer grâce au chan-

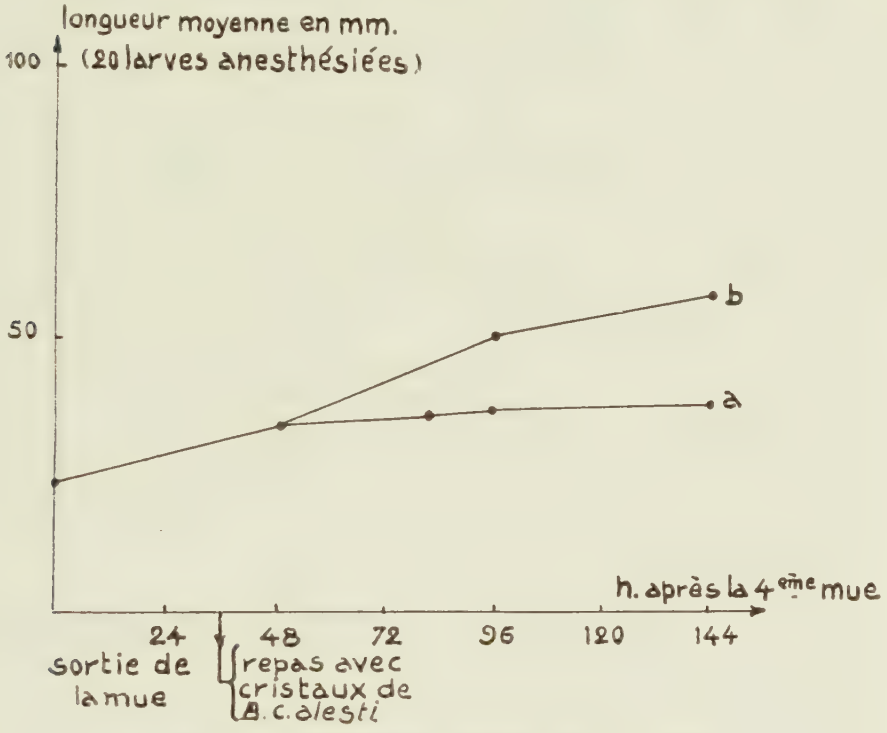


Fig. 14. — Développement linéaire des larves de *B. mori* après (a) et sans (b) ingestion de faibles doses d'inclusions de *B. c. alesti*.

gement de leur couleur en beige-sale et grâce à la diminution de leur turgescence. Ces symptômes deviennent de plus en plus prononcés et au bout de dix jours, les larves ont l'aspect ratatiné et mou.

Le développement pondéral subit également certains changements. La comparaison des moyennes des pesées montre chez les larves traitées un retard s'accentuant au cours du développement larvaire. Les différences observées vis-à-vis du poids des larves saines, sont du même ordre que celles constatées avec la suspension des cultures elles-mêmes.

Parallèlement (figure 14), la croissance linéaire est soumise à une certaine inhibition. La taille est de moins en moins en rapport avec

l'âge des larves. Seules les dimensions de la tête restant normales, donnent des indications sur l'âge.

L'ensemble de ces différences relevées comparativement avec les larves saines, définit un retard général de développement aboutissant à un état d'atrophie prononcé. Cet état évolue progressivement et constitue un effet tardif de l'ingestion d'une très faible quantité de substance toxique de *B. c. alesti*.

c) Dérèglement des crises de mues.

Si une mue se situe peu après (deux premiers jours) l'absorption de la substance toxique, elle se déroule normalement. Ce n'est qu'une légère augmentation des difficultés de sortie de mue, qui amène une différence vis-à-vis des larves saines.

Les mues survenues à partir des cinquième et sixième jours après l'intoxication sont par contre sujettes à des changements importants. En effet, elles se déclenchent avec un retard pouvant dépasser 3 jours, ce qui peut être considéré comme une anomalie dans une population de Vers à Soie élevée dans des conditions définies.

La durée de la mue (maximum de deux jours pour l'ensemble d'un élevage), s'échelonne ici sur cinq jours.

Ceci reflète une irrégularité individuelle prononcée vis-à-vis du déroulement de la crise. Aussi les troubles de mue et les difficultés de dépouillement sont-ils fréquents et souvent mortels.

Ces symptômes sont comparables à ceux se rapportant également aux mues et qui sont occasionnés par l'infection faible avec la culture du germe lui-même.

d) Troubles intestinaux.

Les prélèvements du contenu intestinal, effectués toutes les 24 heures dans l'intestin antérieur, dans les parties antérieure et postérieure du méso-intestin et dans l'intestin postérieur, ne révèlent aucune différence pendant deux jours, entre les Vers sains et les Vers intoxiqués. Ensuite la déshydratation dans l'intestin postérieur faisant de plus en plus défaut, il se forme une masse mi-coagulée plus liquide qu'habituellement et constituée d'un mélange de sécrétion intestinale et de fragments de feuilles. La diarrhée devient fréquente et souvent ininterrompue.

La flore microbienne intestinale, aussi pauvre pendant les deux jours suivants l'intoxication que chez les Vers sains, s'enrichit progressivement tout le long du tube digestif et se présente au bout de 6 jours sous forme d'une pullulation abondante d'éléments hétérogènes. L'espèce qui domine de beaucoup toutes les autres formes, est déterminée dans tous les cas comme *Streptococcus bombycis* Flugge. Les autres germes facultativement présents, et en proportions variables, appartiennent aux *Staphylococcus* et aux *Escherichia*. Notons également la vacuolisation des cellules épithéliales du méso-intestin.

L'ingestion de la substance toxique de *B. c. alesti* en très faibles quantités détermine ainsi l'évolution progressive de troubles au niveau du tube digestif. Ceux-ci amènent une affection intestinale caractérisée tout particulièrement par la diarrhée et la pullulation d'une flore intestinale anormale. Ces conséquences sont comparables à celles de l'infection avec la culture du germe.

e) Influence sur la sensibilité thermique.

Des larves ayant ingéré de la substance toxique ont été soumises à l'effet d'une élévation de température jusqu'à 30°C. pendant 6 heures. Cette expérience a été effectuée exactement dans les mêmes conditions que celle portant sur l'infection bactérienne subaiguë (voir plus haut) sur des larves également au 3^{e} âge. Entre le moment de l'infection et celui du traitement thermique, 4 jours se sont écoulés au cours desquels une légère élévation de la mortalité et des troubles digestifs ont été notés.

Dès le changement de température, une mortalité importante se déclare parmi les larves intoxiquées. Les témoins sont également touchés par la chaleur mais ne montrent qu'une faible différence de mortalité vis-à-vis des lots maintenus à 20°C. Vingt-cinq heures après l'arrêt de l'effet thermique, la mortalité s'étend au lot entier tandis que chez les témoins elle n'augmente que de 4 p. 100. La flore intestinale chez les Vers très affaiblis par la chaleur change au cours des 24 heures suivant le traitement. Le nombre de coccis augmente faiblement chez les Vers sains et fortement chez les Vers intoxiqués. La cause directe de la mort, semble être liée en partie à l'aggravation des troubles intestinaux, mais surtout à une sensibilisation vis-à-vis des températures élevées pouvant s'expliquer en partie par le neurotropisme de la substance toxique.

*
* *

L'ensemble des expériences effectuées avec une dose très faible d'inclusions bactériennes purifiées, montre une similitude des conséquences de telles intoxications avec celles de l'infection subaiguë à *B. c. alesti*. L'action toxique semble ainsi jouer un rôle prépondérant dans la création des effets tardifs évoluant vers un syndrome nouveau. Notons tout particulièrement que le terrain favorable à la pullulation pathologique de *Streptococcus bombycis* dans le tube digestif, peut être préparé par l'action de la substance toxique. Ce fait prédispose indirectement, par l'intermédiaire de ce streptocoque, à la formation de lésions dans la membrane péritrophique et dans les cellules de l'épithélium intestinal.

COMPARAISON DU SYNDROME FINAL AVEC CEUX DE LA GATTINE ET DE LA FLACHERIE

(*Considération du rôle du* Streptococcus bombycis *Flugge dans ces maladies*).

L'ensemble des symptômes externes ainsi que des lésions histologiques vers lesquels le complexe étudié évolue progressivement, nous incitent à le rapprocher du problème si discuté depuis plus d'un siècle, de la flacherie. En effet, le changement de couleur, l'atrophie et la diarrhée sont des points de ressemblance avec l'un des types de la gattine. Les troubles intestinaux, les sécrétions abondantes et l'accumulation des urates ne font que renforcer encore cette analogie. Enfin, l'étude histopathologique confirme d'une part l'identité des lésions tissulaires et particulièrement de celles de l'épithélium intestinal, d'autre part, la ressemblance frappante de la flore microbienne dans la lumière du tube digestif, ressemblance concernant non seulement l'espèce microbienne mais également le mode d'action et de pénétration des microbes à l'intérieur d'un même tissu.

Afin de pouvoir souligner la comparaison avec les lésions de la gattine, il nous semble indispensable d'en faire brièvement l'historique. La gattine était déjà connue des sériculteurs les plus anciens et a été désignée par eux sous les noms de : « Macilenza », « Codotte », « Wassersucht », « Atrophia », etc... D'abord confondue avec la pébrine à cause de l'atrophie, son identité avec la flacherie a entraîné de nombreuses discussions.

Cette question a eu une importance telle qu'elle a figuré aux programmes des Congrès Internationaux de Sériciculture de Udine en 1872, de Rovereto en 1873 et de Montpellier en 1874, comme problème d'étude proposé par l'Assemblée. Les études qui ont suivi cet appel et dont les plus importantes reviennent à Verson et Vlacovich (1875), l'ont apparentée avec la flacherie malgré les différences considérables des symptômes externes des deux affections. Le rôle du *Streptococcus bombycis* a été souligné dès cette époque, et ce microbe a été reconnu d'une façon générale comme caractéristique de la gattine (Sartirana, Paccanaro, 1905). Après plusieurs travaux contradictoires, c'est Paillot qui s'est inspiré particulièrement du rôle de ce streptocoque pour étendre la désignation de gattine à de nombreux cas de flacherie en considérant ce microorganisme comme agent primaire. Il a expliqué les cas de flacheries avec présence de diverses formes bactériennes comme un mélange d'infections avec le streptocoque. Il a même considéré une certaine flacherie comme absolument identique avec la gattine. Il s'agit de la maladie appelée

vulgairement « têtes claires » à cause du thorax particulièrement transparent des larves atteintes (PAILLOT, 1926 b).

Les descriptions histopathologiques de la gattine et de la maladie des « têtes claires » ne diffèrent pas sensiblement d'un auteur à l'autre malgré les discussions sur l'interprétation. Même PAILLOT, qui suppose une intervention virale, présente les diverses phases du développement du streptocoque et de la progression des lésions sans donner de détails contradictoires.

Nous prenons comme exemple, l'une de ses descriptions (PAILLOT, 1928). Il définit l'aspect histologique d'abord par le peu de changements survenus dans les organes situés dans la cavité générale et limités par la membrane basale, puis, il attire surtout l'attention sur les lésions intestinales. Dans la partie postérieure de l'intestin moyen, il observe une agglomération en masse de la chromatine nucléaire, une hypertrophie de ces noyaux et une vacuolisation des cellules intestinales. En dehors du regroupement des mitochondries, il note la destruction de la bordure ciliée et des vacuoles et une augmentation considérable de la sécrétion. A une phase avancée de la maladie, il signale la destruction des cellules de l'intestin moyen et remarque les cellules détachées incorporées dans le contenu intestinal. Il note enfin le développement abondant d'un microcoque, le *Streptococcus bombycis* dans la lumière intestinale en contact avec la paroi épithéliale. Ce microbe a été observé entre les cellules et sur la membrane péritrophique. Enfin, il souligne une propriété cytotoxique du contenu intestinal rempli de ce Streptocoque.

Noux avons nous-mêmes fréquemment examiné les lésions histopathologiques des larves atteintes de gattine, de provenances les plus variées et prélevées le plus souvent dans les élevages de production décimés par la maladie.

Soulignons que l'image histopathologique obtenue dans ces cas était très constante et correspondait de près aux observations de PAILLOT. De plus, au cours des dégâts importants causés en 1954 dans le Midi de la France par la maladie des « têtes claires » il nous a été facile d'étudier l'histopathologie de cette affection. Nous avons trouvé que l'identité de cette maladie avec la gattine, suggérée par PAILLOT (1926 b, 1927 b) est justifiée, les lésions et la flore microbienne étant de même nature.

En vue de faciliter la comparaison rappelons les principales observations histopathologiques présentées plus haut que nous avons constatées à la phase secondaire et tardive du complexe d'enchaînement étudié. D'après ces descrisptions, un microcoque, le *Streptococcus bombycis* domine (presque toujours en exclusivité) le contenu intestinal des Vers malades, dans lequel on le retourve en amas, surtout au contact de la paroi de l'intestin moyen. Il est également présent entre la membrane péritrophique et les cellules épithéliales et entre ces dernières

cellules. Dans cette partie du tube digestif, une hyper-sécrétion, la dislocation de la membrane péritrophique ainsi que le détachement des cellules intestinales ont été décrits. Les changements relevés en dehors du tube digestif étaient très réduits.

Nous n'avons cependant pas l'intention d'identifier la dernière phase du complexe étudié avec la gattine ou avec la maladie des « têtes claires ». Au contraire, grâce à cette comparaison des lésions nous pensons pouvoir montrer qu'aussi bien les lésions typiques de la gattine, que le rôle et l'action du *Streptococcus bombycis*, nécessitent, pour pouvoir se réaliser, une participation à un enchaînement. L'étude expérimentale que nous avons effectuée montre qu'une préparation par une infection toxique très atténuée peut finalement amener ce syndrome. Nous sommes persuadés que d'autres phases primaires peuvent le faire également. Nous avons d'ailleurs pu obtenir certains mécanismes semblables en partant de l'alimentation avec feuilles très tendres pauvres en facteurs nutritifs et en chlorophylle et même en réalisant des chocs de températures.

Le rôle du *Streptococcus bombycis* devient avec cette considération non moins important malgré tout car, en tant que deuxième syndrome après une préparation préalable il semble pouvoir déclencher un tableau symptomatique typique.

CONCLUSIONS

L'analyse d'un type particulier de flacherie de *Bombyx mori* L. a mis en relief que les lésions tissulaires, les anomalies fonctionnelles et l'action microbienne caractérisant le syndrome n'ont pas de signification étiologique. En recherchant des éléments de pathogénèse de plus en plus antérieurs, nous avons été amenés à considérer l'effet primaire d'une « oligo-infection » par une bactérie sporulée, bien que les symptômes normalement provoqués par ce bacille pathogène et toxique (*Bacillus cereus alesti* Toum, Vago) soient absents.

L'étude expérimentale des infections minimes avec ce bacille a dégagé l'absence d'effets immédiats et de symptômes habituellement liés à l'action du microbe. L'infection amène par contre des conséquences tardives s'extériorisant progressivement sous plusieurs aspects :

— Une mortalité faible apparaît, persiste et s'intensifie.

— Le développement est de plus en plus inhibé jusqu'à l'obtention d'une réduction égale pour le poids à un tiers de celui des Vers normaux et pour la taille à la moitié de la longueur de ceux-ci.

— Le moment de l'entrée en mue normalement très régulier pour l'ensemble d'un élevage maintenu dans des conditions alimentaires et atmosphériques précises, est considérablement retardé et échelonné.

— Une flore microbienne anormale se développe progressivement

dans le tube digestif avec pullulation particulière du *Streptococcus bombycis* Flugge.

— La déshydratation de l'aliment incomplètement digéré, est de plus en plus dérangée et un état diarrhéique s'installe.

— Des lésions cytoplasmiques apparaissent au niveau de l'épithélium intestinal et vont en s'aggravant jusqu'au détachement des cellules et particulièrement de celles du méso-intestin.

L'ensemble de ces symptômes physio et histopathologiques définit l'évolution de l'état pathologique vers un syndrome secondaire. Celle-ci est particulièrement accentuée lors d'une élévation de température, même de si courte durée soit-elle. Cette influence thermique, peu nocive pour les larves saines, devient léthale dans 100 p. 100 des cas pour les insectes prédisposés par l'oligo-infection primaire.

Le mécanisme de la pathogénèse et les liens entre les processus successifs se définissent par l'étude histopathologique comme faiblement dus au développement de la bactérie primaire. Ils semblent être surtout en rapport avec l'infiltration de la substance toxique que contient ce microorganisme. Ceci a été confirmé par la suite grâce à des expériences effectuées avec la substance protéinique purifiée obtenue à partir du microbe lui-même. Cette matière administrée par doses extrêmement faibles s'est montrée susceptible de déclencher des processus secondaires semblables à ceux provoqués par l'oligo-infection bacillaire.

*
* *

Du point de vue *pathologie comparée*, ces constatations montrent d'abord que chez les Insectes, un syndrome, même léthal et bien caractérisé, ne peut pas être toujours considéré comme une entité, la cause primaire étant de nature différente. Un diagnostic formulé d'après le syndrome, peut en effet, ne pas avoir de signification étiologique.

Elles mettent ensuite en évidence qu'une infection spécifique peut se présenter sous forme d'un tableau symptomatologique plus général ou propre à d'autres affections.

Elles attirent également l'attention sur les conséquences que peut avoir, par suite des processus progressifs qu'elle déclenche, une oligo-infection microscopiquement indécelable chez l'hôte.

Elles soulignent enfin le pouvoir d'un effet toxique bactérien extrêmement faible pour préparer un terrain favorable à l'évolution de processus pathologiques secondaires.

*
* *

Ces mêmes constatations ont des répercussions directes vis-à-vis de l'un des problèmes les plus discutés de la pathologie des Insectes, celui

des *Flacheries*. Cette question a en effet opposé de nombreux chercheurs (voir début du chapitre) aussi bien à cause de l'importance doctrinale que des conséquences économiques de la maladie.

Les difficultés étiologiques ont toujours convergé vers cet état de dysenterie qui caractérise la flacherie. On a attribué à ce syndrome une signification étiologique ainsi qu'aux bactéries présentes, notamment au *Streptococcus bombycis*. Cependant, des doutes ont été émis en ce qui concerne le rôle pathologique de ces germes et le problème du développement de cet état pathologique a été posé. A l'heure actuelle, il n'a toujours pas été éclairci, bien que la compréhension de la flacherie lui soit étroitement liée.

Nous avons montré expérimentalement qu'une oligo-infection pratiquement impossible à mettre en évidence peut induire un processus aboutissant à un syndrome comparable à celui qui a été discuté et nous avons assisté à l'évolution de la flore caractéristique, dominée par le *Streptococcus bombycis*.

Ces résultats montrent la nature secondaire des symptômes et de la flore particulière si discutée chez les flacheries. Par ce fait même ils soulignent la nécessité de considérer ces maladies comme des complexes à plusieurs phases. L'association avec l'oligo-infection par le *cereus* n'est qu'un exemple de tels complexes et bien d'autres causes primaires semblent pouvoir aboutir au même syndrome.

Le cas particulier d'enchaînement oligo-infection — flacherie mérite cependant une mention spéciale. En effet, lors de la mise en évidence, en 1951, de l'agent de la flacherie infectieuse sous forme d'une souche particulièrement virulente de *B. cereus*, nous avons considéré surtout des infections assez intenses avec toxémies ou septicémies typiques. Or, nous avons noté la fréquence simultanée d'autres flacheries avec dysenterie et pullulation du *Streptococcus bombycis*. Ces cas ont diminué dans les éducations où nous avons réussi à éliminer l'endémie à *B. c. alesti*. Partant de ces faits, nous avons montré que l'infection par *B. c. alesti* (surtout en état d'endémie) se fait également avec des doses extrêmement faibles amenant alors non pas des toxi-speticémies immédiates, mais une dysenterie secondaire. Nous pensons même que cette action atypique peut être considérée comme aussi importante, si ce n'est plus, que les cas aigus.

Un problème, séricicole posé depuis très longtemps, semble trouver une explication grâce aux résultats relatés : Les sériciculteurs connaissent et craignent l'apparition de la flacherie après une élévation de température même si cette dernière (de courte durée et ne dépassant pas 30°C.) ne paraît justifier aucun effet nocif. D'après nos expériences, la sensibilité thermique exceptionnelle que confère aux Vers l'oligo-infection à *B. c. alesti* situe l'étiologie comme une infection primaire minime, qui

passe inaperçue au cours de l'élevage avant l'effet secondaire mais révélateur de la chaleur.

***

Notons également certains rapports avec les *insectes nuisibles* aux cultures. En effet, sur de nombreux Lépidoptères et Coléoptères, des affections spontanées à *B. cereus* cristallophores (groupe *Thuringiensis*) ont été signalées. L'action de ces bactéries a été décrite comme étant à quelques modalités près, comparable à celle due à de fortes doses de *B. c. alesti*. Or, l'enchaînement partant des infections faibles peut se réaliser également entre certains cas de dysenterie des Lépidoptères nuisibles et une oligo-infection primaire à *Thuringiensis*. Mentionnons sur *Pieris brassicae* l'obtention de tels phénomènes en relation avec la souche « Anduze » où malgré certaines différences vis-à-vis de *B. mori*, relatives à la dose d'infection et à la pénétration bactérienne plus active, des effets tardifs avec atrophie progressive et dysenterie, se sont manifestés

Nous avons retrouvé de telles conséquences sur d'autres espèces et nous attirons l'attention sur l'importance et la fréquence d'infections très faibles sur Insectes dans la nature.

D'un autre côté, lors des applications des cultures de *cereus* dans la nature en vue de réaliser une lutte biologique contre les ravageurs des cultures, à côté des Insectes qui absorbent une dose déclenchant la maladie typique, se trouvent d'autres individus ne recevant qu'une infection minime. Dans ce dernier cas, les effets seraient à rechercher sous forme de syndromes atypiques tardifs et même ressemblant à ceux d'autres affections.

Chapitre IV

COMPLEXE VIROSE — SEPTICÉMIE BACTÉRIENNE

ORIGINE DE LA MISE EN ÉVIDENCE DU COMPLEXE. LES SEPTICÉMIES A AGENTS FACULTATIVEMENT PATHOGÈNES

L'un des types de liaisons d'affections pathologiques que nous avons étudié a été analysé à la suite de l'observation d'un mode d'action bactérienne, difficile à expliquer. Notre attention a été attirée par des cas, d'ailleurs très rares, de septicémies d'une importance inhabituelle dues cependant à des bactéries faiblement virulentes. De tels contrastes

ressortent également à l'analyse de plusieurs affections à bactéries facultativement parasites des Insectes comme *Aerobacter aerogenes* (KRUSE), *Escherichia coli* (MIG), *Bacterium sphingidis* WHITE, *Bacterium noctuarum* WHITE, *Bacillus* (?) *agrotidis* POSP. *Bacillus putidus* FLUGGE (GLASER, 1918 b, NORTHRUP, 1914 a ; STEINHAUS, 1949 b ; WHITE, 1923 a, b ; CAVARA, 1899 ; POSPELOV, 1927). Même sur un Lépidoptère sélectionné depuis de nombreux siècles comme *Bombyx mori* L. des vagues de septicémie ont été observées en liaison avec les *Serratia* (MASERA, 1934, VAGO, 1950) dont la virulence a souvent été discutée (STEINHAUS, 1949 b).

De tels microorganismes sont à première vue incapables d'une telle action, ceci pose le problème de l'élément complémentaire favorisant.

Une étude bibliographique n'a pu nous fournir aucun détail sur les causes de ces phénomènes pathologiques. En effet, bien que la question se soit posée tout au long de l'histoire de la pathologie des Insectes d'une façon plus ou moins indirecte, l'étude de ces mécanismes n'avait pas été envisagée jusqu'alors.

Nous avons eu l'occasion d'observer quelques cas de septicémies graves en relation avec des souches bactériennes peu virulentes. Nous les mentionnerons rapidement puis nous nous arrêterons sur l'un d'entre eux.

Chez les larves de *Thaumetopoea pityocampa* SCHIFF provenant du Midi de la France, nous avons constaté, toujours à l'état sporadique, une affection septicémique à *Bacterium paracoli* GILB. et LION. En 1951, la même maladie a été retrouvée à Grabels près de Montpellier. Elle affectait plus de 50 p. 100 des nids, prélevés dans une jeune pinède de 1 km_2 environ. La bactérie isolée, administrée « per os » et à très forte dose (1 anse/1 cm^3 d'eau physiologique) à des larves du deuxième âge, n'a déclenché qu'une mortalité insignifiante (0,8 p. 100). Ces observations rejoignent d'ailleurs certaines remarques de DUFRESNOY (1919) signalant sur *Thaumetopoea* une infection à coccis dont l'agent a été désigné comme *Streptococcus pityocampae* DUF. D'après les conceptions actuelles, cette souche (mobile et Gram négatif) ne peut pas être rangée parmi les Streptocoques. Il paraît également difficile de préciser les rapports de ce germe avec *Bacterium pityocampae* DUF. mentionné par ce même auteur.

Chez *Vanessa urticae* L., Lépidoptère rarement sujet à septicémie, nous avons constaté en 1954 à Lesperon (Ardèche) la destruction totale de la population d'une touffe d'orties par l'action d'une souche d'*Enterococcus sp.* La vague épizootique s'est déroulée en 5 jours sur des larves au dernier âge. La bactérie isolée virulente par injection, n'a donné, après infection « per os » de larves du deuxième âge, que 2 p. 100 de mortalité échelonnée sur toute la vie larvaire.

Nous nous arrêterons plus longuement sur l'exemple des septicémies constatées sur *Lymantria dispar* L. dans les départements de l'Hérault

et du Gard. Chez ce Lépidoptère non plus, les maladies septicémiques ne sont pas courantes. En effet, au cours des diagnostics pathologiques effectués pendant 5 ans, à l'occasion des invasions signalées par le Service des Eaux et Forêts, peu de cas ont pu être reconnus et ceci même sur des exemplaires isolés. Par opposition à ces caractéristiques d'endémie à faible intensité, se détachent des cas exceptionnels comme celui constaté en 1953 sur des larves provenant d'une forêt de chênes verts des environs de Quissac (Gard). La mortalité par septicémie s'élevait à 58 p. 100 (calculé sur 10 prélèvements de 100 larves avant nymphose). Sur le terrain de nombreux cadavres recouvraient les troncs d'arbres. Par la suite, l'examen des larves vivantes affaiblies devait confirmer la présence de la septicémie dans tous les cas (agent pathogène, voir plus loin). Une réaction phagocytaire décelable par la présence de 5 à 18 germes dans le cytoplasme des micro-nucléocytes, a été régulièrement observée.

Ces symptômes n'ont jamais pu être retrouvés ni au cours de la même génération chez les chenilles localisées à 26 km de ce point, ni au cours de la génération suivante chez celles vivant en ce même endroit.

En 1954, un phénomène comparable à celui que nous venons de décrire a pu être constaté à Laurac (Ardèche). Sur 10 prélèvements de 100 larves chacun, effectués dans un bois de chênes verts (secteur rendu suspect par la présence de nombreux cadavres sous les arbres), nous avons enregistré 62 p. 100 de mortalité par septicémie. Les larves se trouvaient à ce moment là aux quatrième et cinquième stades. Au moment de la nymphose, dans la même population (sur un total de 1.000 larves) la septicémie n'a pu être déterminée que dans la proportion de 0,5 p. 100. L'année suivante aucune mortalité particulière n'a été enregistrée.

Nous avons également pu suivre de telles différences d'états d'infection au cours d'un élevage non soumis à des traitements pathologiques. En 1953, au moment de la constatation de l'épizootie à Quissac, 8 lots de 50 larves chacun ont été formés à partir d'échantillons provenant d'Uzès, Anduze, Ribaute (Gard), Aubenas, Lagorce (Ardèche), Avignon (Vaucluse), Montpellier (Hérault), Sainte-Croix-Vallée-Française (Lozère). Après un séjour de 10 jours dans des cages grillagées placées dans une chambre climatisée ($18 \pm 1°C.$, 70 ± 5 p. 100 H. R.) une forte mortalité s'est déclarée dans les lots de Quissac et Aubenas, atteignant respectivement 12 et 18 p. 100 des larves, tandis que dans les autres lots, une perte de 2 p. 100 au maximum a été enregistrée. Dans ces essais préliminaires de tâtonnements, la maladie exacte n'a naturellement pas pu être déterminée dans les cadavres, le développement post-mortem de la flore microbienne ne nous ayant pas permis de nous prononcer sur la pathogénèse. Toutefois, la grande différence de mortalité entre les deux

lots mentionnés et tous les autres, montre que ces populations étaient en état d'infection avancée.

Nous avons recherché avant tout les raisons de telles extensions épizootiques des septicémies. Nous avons étudié l'affection en envisageant que l'apparition des épizooties pouvait être liée à une propriété de l'agent pathogène lui-même.

Chez *Lymantria*, GLASER (1918 b) a signalé une infection à coccis dont l'agent a été désigné comme *Streptococcus disparis* GLASER. Les larves atteintes ont l'aspect « flat » et souffrent de diarrhée. Après multiplication de la bactérie dans le méso-intestin, la pathogénèse montre une septicémie. GLASER insiste particulièrement sur les lésions au niveau du tissu musculaire.

Pour les cas de speticémie que nous avons observés et mentionnés plus haut, la nature des affections a nécessité la réalisation d'hémocultures à partir d'insectes atteints, de provenances diverses. Le microbe obtenu en culture présente toujours les mêmes propriétés morphologiques et bien que nous n'ayons pas suivi ses réactions biochimiques dans chaque cas, son comportement vis-à-vis de la réaction de Gram, sa mobilité et son affinité pour les glucides, sont toujours les mêmes. D'ailleurs il est rare de trouver dans l'hémoculture d'autres bactéries que celle en question. Sur la gélose nutritive à 30°C., la bactérie se développe bien. A 15°C. le développement est encore assez abondant. Des colonies grisâtres se forment à surface brillante et lisse. Un hétéromorphisme est à noter, entre les germes développés dans le sang et ceux obtenus par culture. Les premiers se présentent sous forme de bacilles à bouts arrondis, de longueur 3 μ, tandis que les mêmes une fois passés sur le milieu artificiel, adoptent la forme et la taille de cocobacilles de 1,5 à 2 μ de long. La culture inoculée dans le sang donne à nouveau naissance aux formes ovoïdes de grande taille. Nous nous trouvons ici en présence d'un phénomène ressemblant à ceux signalés par PAILLOT (1933) concernant certaines souches bactériennes entomophytes comme *Bacterium pieridis liquefaciens* PAIL. et *Bacterium lymantriacola adiposus* PAIL. chez lesquels une variation de forme et même de taille suivant les espèces hôtes a été notée.

L'une des souches a été transmises au Docteur BUTTIAUX qui a classé le germe parmi les *Bacterium paracoli* GILB. et LION.

L'inoculation de la culture pure dans l'hémolymphe de larves aux quatrième et cinquième âges, amène une mortalité de 100 p. 100 en 24 heures. Le sang des Vers affaiblis est légèrement mélanisé, il reste limpide et ne se résorbe pas, comme c'est le cas dans la plupart des affections bactériennes intestinales. L'hémolymphe est remplie de la bactérie pré-citée sous sa forme large et nous avons toujours pu réisoler le même microbe sans être dérangés par d'autres germes. La souche

bactérienne étudiée a donc la possibilité de se développer dans l'hémolymphe et de se généraliser rapidement sous forme de septicémie, si elle est introduite directement dans la cavité générale. Cette rapidité de développement détermine l'inefficacité de la réaction phagocytaire, qui est pourtant active ainsi qu'en témoigne la présence de plusieurs éléments bactériens dans le cytoplasme des micro nucléocytes.

Afin de suivre la voie naturelle d'infection, nous avons effectué des contacts par voie buccale avec la même culture pure. Ces expériences portant sur 1 000 larves, ont consisté en l'alimentation de ces dernières pendant 3 heures avec des feuilles de chênes verts, préalablement traitées avec une suspension aqueuse de la culture (concentration 1 anse de culture pour 5 cm^3 d'eau). Après 24 heures d'incubation, une mortalité faible s'est poursuivie pendant 10 jours affectant à ce moment là 3 p. 100 du lot.

L'examen du tube digestif des larves affaiblies, montre un développement modéré du germe dans le méso-intestin. Ce développement est bien moins important dans la lumière intestinale, qu'au contact de la couche épithéliale. A un stade avancé de l'affaiblissement, une septicémie typique caractérise le syndrome généralisé.

Les réactions phagocytaires sont assez actives, et on relève couramment dans le cytoplasme des micronucléocytes 4 à 6 éléments bactériens.

Nous avons également pu préciser des signes de réaction humorale. En effet, le contour des bactéries est souvent élargi au début de l'infection du sang. Les corps bactériens se colorent irrégulièrement et sont agglomérés en groupe collés les uns contre les autres. Cet aspect traduit l'action d'anticorps des types lysine et agglutinine, observés chez d'autres insectes par Paillot (1933), Zernoff (1931), Glaser (1918 b).

L'histologie met en évidence d'une façon formelle la nature septicémique de cette affection, les tissus épidermiques, adipeux, musculaires, péritrachéaux n'étant pas envahis par des éléments bactériens ni au début, ni à un stade avancé de l'infection.

L'ensemble de ces expériences montre que cette bactérie est pourvue de virulence « per os » mais à un degré réduit. Un développement modéré, en contact avec l'épithélium intestinal, prépare le passage du germe dans la cavité générale, où il se développe alors assez aisément. C'est une affection dans laquelle les *prédispositions individuelles* ou momentanées paraissent susceptibles de déterminer le succès ou l'insuccès du passage du germe de la lumière intestinale dans les tissus épithéliaux et dans l'hémolymphe.

CO-INFECTION VIRALE INAPPARENTE

L'étude de la pathogénèse de la septicémie bactérienne n'ayant pu mettre en évidence une forte virulence des souches de *paracoli* responsables de cette affection, il ne nous a pas semblé possible d'attribuer l'apparition épizootique exceptionnelle à un tel facteur. Par contre, les facultés d'accumulation et de pénétration réduites, nous ont amenés à envisager la présence lors des extensions épizootiques, d'un ou plusieurs facteurs favorisants.

Afin de rechercher de tels facteurs, nous avons d'abord étudié l'influence de certaines conditions atmosphériques. Pour cela, dans une chambre climatisée à circuit d'air continu (voir « méthodes »), nous avons expérimenté sur des larves isolées l'effet de l'augmentation brusque de l'hygrométrie (de 50 p. 100 à 95 p. 100 en 10 minutes) et de la température (de 14°C. à 32°C. en 5 minutes) ainsi que la synergie des deux changements (H. R. = 95 p. 100, t = 32°C.) avec ralentissement d'aération.

Nous ne donnerons pas les détails de ces essais, car les résultats des examens histopathologiques menés parallèlement à ceux-ci ont rapidement modifié l'orientation de nos travaux.

En effet, la microscopie directe des tissus adipeux et péritrachéaux ainsi que l'histologie de chaque lot, nous ont permis d'avancer dans l'explication de l'extension locale de cette septicémie. Dans tous les lots (comme d'ailleurs dans toutes les populations examinées au cours d'autres travaux sur *Lymantria*) nous avons retrouvé quelques corps d'inclusion polyèdriques dans les cellules adipeuses de certaines larves. Proportions pour cinq lots de Genolhac (Gard) 1953 : 0,5, 7, 1, 3, 2,4 p. 100, et de Vallon (Ardèche) 1954 : 0,2, 2, 2,2, 1, 1,2 p. 100. Ce sont là des constatations tout à fait banales, car il existe rarement des populations de *Lymantria* exemptes de viroses mi-latentes à polyèdres. Nous avons noté au cours de ces examens, que dans deux lots, cette faible polyèdrie était présente chez un nombre important de larves (71 et 63 p. 100). Ces lots étaient ceux originaires de Quissac et d'Aubenas, c'est-à-dire ceux chez qui la septicémie inhabituelle a été notée. Signalons que cette même polyèdrie a également été diagnostiquée sous forme aiguë, dans 1 p. 100 environ des chenilles examinées des deux lots en question.

Ces prospections comparatives ont attiré l'attention sur l'éventuel rôle d'une virose dans l'évolution des épizooties de septicémies à *Bacterium paracoli*. Elles nous ont amené de ce fait à l'étude plus détaillée des infections virales chez *Lymantria dispar*.

Ces travaux effectués périodiquement pendant 4 ans, ont été basés aussi bien sur des examens de larves provenant de la nature que sur des infections expérimentales. Les affections virales chez cet Insecte nous

paraissent aujourd'hui particulièrement complexes. Elles réservent des surprises et montrent certaines contradictions vis-à-vis des données classiques.

L'existence d'une virose chez *L. dispar* a été reconnue dès le début des études de viroses d'Insectes (Glaser-Chapman, 1912, 1913, 1915, Glaser, 1915). Elle est liée à la formation de corps d'inclusions polyèdriques, et symptomatologiquement correspond aux « Wilt diseases » de nombreux Lépidoptères. Histologiquement, le virus a une affinité vis-à-vis du tissu adipeux, des cellules sanguines et du tissu épidermique. Il présente d'après l'emplacement des corps d'inclusion, un nucléotropisme net. L'ensemble de ces propriétés le range parmi les *Borrelina*, selon la nomenclature en vigueur jusqu'au Congrès International de Microbiologie de Rome en 1953 (Steinhaus, 1953). (Le projet d'une nouvelle nomenclature a été prévu à cette époque là, mais celle-ci n'est pas encore établie). Holmes (1948) l'attache à l'espèce : *L. dispar*, et la désigne sous le nom de *B. reprimens* Holmes. C'est cette virose que nous avons le plus fréquemment rencontrée au cours de nos essais. Cependant, notons que certaines caractéristiques de l'action virale ne correspondent pas entièrement à ces affinités tissulaires. Ainsi, nous avons été surpris dans beaucoup de cas, par la pauvreté en polyèdres de l'hémolymphe. Par contre, des altérations pathologiques nettes ont été relevées dans la paroi épithéliale du méso-intestin, consistant en une hypertrophie des cellules et en la disparition de leurs limites. A un stade avancé de la maladie, ces cellules renferment un grand nombre de polyèdres. Ils ont un diamètre de 2 à 4 μ peu homogènes de taille et réfringents. Leur contour se colore faiblement avec le bleu victoria et l'hématoxyline ferrique les pénètre d'une façon imparfaite. En dehors de cette localisation dans les cellules intestinales, la caractéristique la plus marquante de cette affection vis-à-vis de la première polyèdrie, est l'accumulation des corps d'inclusion dans le cytoplasme. Au microscope électronique les corps d'inclusion apparaissent sans membrane et les corps élémentaires sont cocciformes. Ces caractéristiques rapprocheraient cette virose de celle observée par Smith et Wyckoff (1950) dans les larves d'*Arctia villica* L., et par Vago et Vasiljevic (1955) chez celles de *Thaumetopoea pityocampa* Schiff.

Grâce à des infections expérimentales « per os » cette virose a été reproduite, mais il nous a été impossible de trancher la question d'une indépendance vis-à-vis de la polyèdrie intra-nucléaire. En effet, dans certaines larves, nous avons mis en évidence par histopathologie, des corps d'inclusion polyèdriques dans les tissus adipeux et péritrachéaux mais avec localisation essentiellement cytoplasmique. Ces caractéristiques ne concordent avec aucun des types de viroses connus. Les *Borrelina* attaquent le tissu adipeux, mais forment des inclusions nucléaires, alors

qu'ici dans ce même tissu, ces inclusions sont cytoplasmiques. D'un autre côté, dans le cas d'inclusions cytoplasmiques du type *Smithia*, celles-ci sont limitées à l'épithélium intestinal. Il n'est ainsi pas possible, à l'heure actuelle, de classer le virus de cette polyèdrie ni parmi les *Borrelina*, ni parmi les *Smithia*. Enfin, notons également qu'à côté des cas nucléaires ou cytoplasmiques, nous avons rencontré aussi des cas avec présence simultanée des polyèdres cytoplasmiques dans le tissu adipeux et dans les cellules intestinales. Les travaux en vue d'approfondir la distinction (morphologie des virus au microscope électronique) sont en cours mais n'ayant pas de rapport direct avec les phénomènes d'enchaînement, ils seront traités ailleurs.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DES RAPPORTS ENTRE VIROSES ET SEPTICÉMIES

Les relations entre certaines polyèdries et septicémies, envisagées à la suite des cas spontanés observés dans la nature, ont été étudiées avant tout par des tentatives de reproduction expérimentales de la co-apparition.

Ces travaux ont demandé des essais préliminaires. Il était en effet nécessaire, pour pouvoir expérimenter sur le « type biologique » choisi, de rechercher des affections pathologiques propres à *Bombyx mori* et qui soient susceptibles de se combiner par des actions semblables à celles qui viennent d'être décrites.

Pour la partie « virose » nous avons choisi naturellement la polyèdrie à *Borrelina bombycis* seule affection virale connue chez ce Lépidoptère. En effet, il aurait été trop hasardeux de partir sur la non-spécificité des viroses d'Insectes, car à l'heure actuelle, cette conception repose sur des bases encore fragiles. Signalons d'ailleurs, que cette virose est très voisine de celle de *Lymantria dispar L.* En effet, les deux virus ont une affinité vis-à-vis des tissus adipeux, sanguins, épidermiques et péritrachéaux ; quant à l'épithélium intestinal et aux muscles, ils sont réfractaires dans les deux cas. Les deux virus sont caractérisés par un nucléotropisme et par la formation de corps d'inclusions polyèdriques intranucléaires. Enfin, la morphologie des corps élémentaires des virus est semblable. Ces corps apparaissant après désagrégation des polyèdres dans des solutions à pH élevé sont bacilliformes et groupés en faisceaux.

Les dimension de ceux de *L. dispar* ont été définies par Bergold (1947) comme 41 mμ/362 mμ, celles de *B. mori* par Bergold (1947) comme 40mμ/279 mμ.

Les souches bactériennes isolées des larves de *B. mori* atteintes de septicémies appartiennent en majeure partie aux *Micrococcus*, plus rarement au groupe des *paracoli* et aux *Serratia*. C'est une souche de

Bacterium paracoli isolée en 1050 à Saint-Étienne-Vallée-Française (Lozère) que nous avons retenue pour les essais de reproduction expérimentale.

Pour la mise au point des essais, nous avons eu des difficultés pour définir à priori l'ordre de succession des deux affections. En effet, la forte densité du développement bactérien dans les cas spontanés, n'implique pas la priorité de cette infection. L'évolution modérée de la virose ne signifie pas non plus une attaque récente. Comme nous l'avons signalé plus haut, les polyèdries peuvent rester longtemps limitées à un nombre réduit de cellules. Elles peuvent même chez *B. mori* ne pas atteindre pendant plus de trois âges une extension entraînant des conséquences fonctionnelles graves pour un organe. La bactérie en question ne cause pas non plus obligatoirement une septicémie et les infections peuvent ne pas aboutir à une affection pathologique, bien que les bactéries persistent pendant un certain temps au niveau de l'épithélium intestinal. Il a donc été possible d'envisager les deux affections comme préexistantes.

Après plusieurs essais « pour voir » nous avons réuni en une seule expérience d'ensemble les différents types de décalage chronologique entre les infections artificielles. L'apport séparé de virus et de bactéries a également été incorporé dans ce cadre afin de voir les influences sur les infections préexistantes. Ainsi ont été comparées les conséquences :

— de l'absence d'infections artificielles,

— d'une infection virale,

— d'une infection bactérienne,

— d'une infection bactérienne suivie au bout de 72 heures d'une infection virale,

— d'une infection virale et d'une infection bactérienne simultanées,

— d'une infection virale suivie au bout de 72 heures d'une infection bactérienne.

Ces essais ont été réalisés, pour chacun des six types d'infection sur 10 lots de 100 larves chacun, dans une chambre climatisée, à circulation d'air constante ($t = 22 \pm 0{,}5°C.$, H. R. $= 70 \pm 5$ p. 100).

Les larves sont infectées « per os » avec un repas de feuilles de mûrier préalablement trempées pendant 15 minutes dans une suspension de culture pure de la bactérie (concentration de 1 anse de culture sur 5 cm^3 d'eau) ou dans la suspension de corps d'inclusion purifiés, obtenue à partir des insectes virosés. Afin d'obtenir un effet discriminatif, la concentration en polyèdres est très faible : environ 1 000 corps d'inclusion par mm^3 de suspension. Le repas infectant reste 3 heures en contact avec les larves et est suivi d'une alimentation normale.

Les cas pathologiques sont enregistrés grâce à des observations fréquentes réparties sur les 24 heures (pendant 20 jours). Entre la der-

nière observation du soir, et la première du matin il ne s'écoule que 8 heures. Cette précaution est nécessaire pour pouvoir établir les diagnostics sur des exemplaires très affaiblis mais non morts. En effet, le développement « post mortem » de la flore bactérienne de l'hémolymphe étant extrêmement rapide, l'examen des cadavres même très récents entraînerait des confusions quant à la reconnaissance d'une septicémie.

Chaque insecte très affaibli (état déterminé par le symptôme de l'impossibilité de déplacement) est examiné par prélèvements des tissus sanguins, adipeux et intestinaux en vue d'établir la présence :

— de la virose seule,

— de la bactérémie seule,

— de la virose et de la bactérémie simultanée,

— d'autres causes sans les syndromes précédents.

D'après les données du tableau n° II, la virose à polyèdres apparaît dans tous les lots, même dans les lots témoins. Ceci s'explique par le fait, démontré antérieurement (Vago, 1951 b) qu'à l'heure actuelle pratiquement toutes les races commercialisées de Ver à Soie sont porteuses du virus de la polyèdrie.

Les cas de virose deviennent plus nombreux à la suite d'une infection « per os » avec les corps d'inclusion. La courbe d'évolution s'élève après 6 à 8 jours d'incubation.

D'autre part, la septicémie à *B. paracoli* apparaît, elle aussi (selon les données des lots A) spontanément mais beaucoup plus rarement que la polyèdrie.

L'infection « per os » avec la bactérie seule, déclenche une mortalité septicémique légèrement différente de celle se produisant spontanément et témoigne d'une virulence réduite. L'apparition très échelonnée de la maladie après l'infection, confirme la constatation d'une action lente. Elle montre en même temps une certaine persistance de la souche dans l'hôte infecté.

Soulignons que parmi les cas de septicémie enregistrés chez les larves non traitées (lots A) et chez celles ayant ingéré de la culture bactérienne (lots C) plusieurs présentaient en même temps les signes histologiques de la virose en voie de généralisation. La coexistence spontanée des deux affections se retrouve ainsi dans nos expériences, même sans l'obligation d'une double intervention.

Les infections virusales combinées à l'apport de *B. paracoli* montrent qu'il est peu probable que la pathogénèse du virus soit favorisée par l'affection bactérienne.

L'évolution des septicémies est légèrement influencée par l'ingestion des bactéries précédant le contact avec le virus. En effet, les proportions des bactéries augmentent faiblement non seulement immédiatement après l'infection bactérienne mais surtout au cours de l'évolution des

TABLEAU II. — *Effets des infections séparées et combinées à* Borrelina bombycis *et* Bacterium paracoli *sur larves de Bombyx mori (3eme âge).*

V = Syndrome de virose à polyédres. S = Syndrome de septicémie à *B. paracoli*.

Groupes de 10 lots de 100 larves chacun	Mortalité avec diagnostic (Heures)											
	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	268
A. — Absence d'infections expérimentales :												
1											I V	
2												
3		I V										
4												
5												
6					I S		I V					
7												
8	I V											
9												
10												
B. — Infection virusale seule.												
1									I V			I V
2							I V					
3		I V										
4							I S		2 V			
5				I S							2 V	
6											I V	
7									I V			I V
8								I S				
9	I V				I S			I V				
10									2 V			I V
C. — Infection bactérienne seule.												
1		I S						I S	I V			
2				I S					I S	I V		
3						2 S						
4		I V										
5					I S							
6							I S					
7												
8				I V								
9					I V							
10												

Infect. virus.

Infect. bact.

Tableau II. *(suite).*

V = Syndrome de virose à polyèdres. S = Syndrome de septicémie à *B. paracoli*.

Groupes de 10 lots de 100 larves chacun		Mortalité avec diagnostic (Heures)											
		24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	268
D. — Infection bactérienne + infection virusale 72 h plus tard.													
1	Infect. bact.				Infect. virus					I S	I S		
2				I S							I S		2 V
3					I S	I V			I V			I S	2 V
4										I S			
5			I V				I S					I V	3 V
6					I S				I S				
7			I S										I S
8													
9													
10													
E. — Infection bactérienne + infection virusale simultanée.													
1	Infect. bact. infect. virus					I S	I S			I S I V			
2											I V		I S
3				I S					I S		I V	2 V	
4			I S					I S		I V			I V
5								2 S					
6					I S		I S		I V				I V
7		I V	I S								I S	2 V	
8									2 S				I V
9													
10													
F. — Infection virusale + infection bactérienne 72 h plus tard.													
1	Infect. virus.				Infect. bact.					I V I S		I S	
2			I V										2 V
3								I V					
4								2 S	I S		I V		
5					I S		I S			S S I V			I S
6				I S		I S		I S					
7							I S	I S				I V	
8									I S			2 V	
9											I V		3 V
10							I S				I V		

viroses. Ceci, mis en parallèle avec les conséquences d'une infection bactérienne seule, dénote une certaine influence virale.

L'infection simultanée avec les deux agents pathogènes a pour conséquence une augmentation des cas tardifs. C'est un effet de même nature que le précédent mais moins prononcé.

Quand l'ingestion des bactéries suit l'infection à virus, les deux affections s'associent plus souvent et la virose à déroulement normal sans complication devient moins fréquente.

De l'ensemble de ces essais se dégage la possibilité d'observer expérimentalement certains rapports entre une virose et une septicémie et de noter des ressemblances avec les cas spontanés relatés plus haut.

En effet, l'action septicémique d'une souche de *B. paracoli* très rare dans les élevages sains, s'accentue lors de l'installation d'une polyèdrie. Lors d'une infection contrôlée avec cette bactérie, l'apparition de septicémie est plus fréquente sur les larves virosées que sur les larves saines. Les mêmes essais soulignent la relative rareté des cas de complexes obtenus même avec infections assez intenses. La probabilité de l'établissement d'un rapport semble être en relation avec la coïncidence des stades d'évolution de la virose et du moment de l'infection bactérienne. Le moment optimum ne semble pas se situer au stade très avancé de la virose car la présence préalable de la bactérie favorise l'établissement d'un complexe.

Ces essais de reproduction expérimentale fournissent également un renseignement fondamental pour l'étude de la pathogénèse du complexe En effet, d'après la comparaison des conséquences des infections séparées, simultanées ou décalées, l'affection conditionnant l'établissement d'un complexe semble être la virose à *Borrelina*. Ce fait n'exclut cependant pas la préexistence de l'agent bactérien que nous devons admettre d'après la comparaison des proportions des complexes obtenus.

ACCÉLÉRATION DE L'EFFET LETHAL

Avant d'étudier la pathogénèse du complexe par l'histopathologie, il nous a paru indispensable d'approfondir certaines différences entre les caractéristiques chronologiques du déroulement de la virose combinée à la septicémie et celles du processus normal de l'action virale.

En effet, nous nous sommes arrêtés au cours des examens de diagnostics de la polyèdrie et de la septicémie dans une même population, sur la rareté des cas de virose au moment de l'apparition intense du complexe virose-septicémie. Nous avions vu ici une éventuelle caractéristique de l'effet de la synergie des deux affections.

Pour l'étude expérimentale de ce phénomène, un lot de 1 000 larves de *B. mori* au troisième âge a été infecté « per os » simultanément avec

une suspension de polyèdres purifiés (dosés à 1 000 000 d'éléments par cm^3) et une suspension de culture de *B. paracoli* (dosée à 1 anse de culture par 5 cm^3 d'eau). La mortalité journalière (voir technique d'observation plus haut) a été ensuite consignée au cours de l'élevage en chambre climatisée à 22 ± 5°C. et 70 ± 5 p. 100 d'humidité relative, en comptant séparément les cas reconnus comme septicémiques et ceux aboutissant à une virose seule. La figure 15, indiquant l'intensité de la mortalité en fonction du temps, traduit un décalage de l'évolution de la maladie. En effet, bien que la virose-septicémie et la virose seule se rencontrent toutes deux sporadiquement pendant une longue période, la majorité

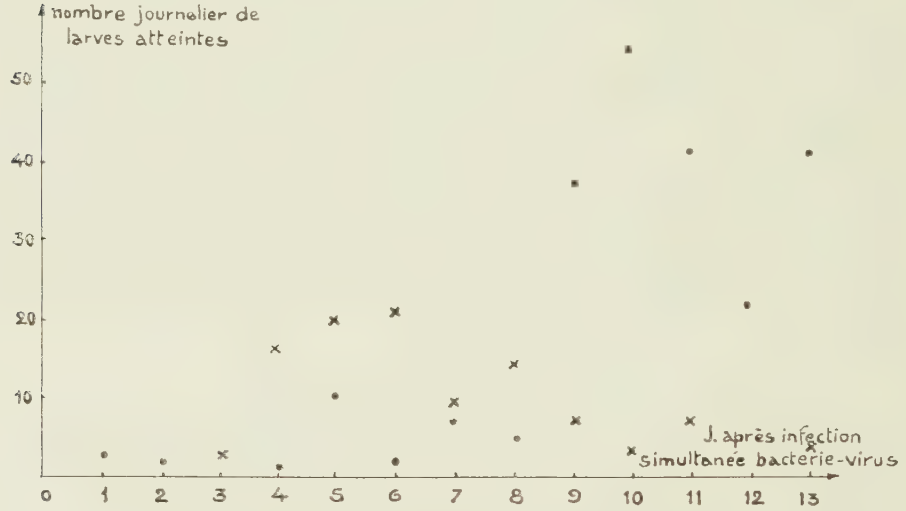


FIG. 15. — Décalage de l'apparition des cas de virose et de septicémie avec virose parmi 10 000 larves de *Bombyx mori* (4e âge). ● virose, × septécimie avec virose.

des larves mortes de la polyèdrie suivie de septicémie, se situe plus de 5 jours avant la période d'une mortalité par polyèdrie seulement.

Ces observations ont été complétées par des calculs sur la durée de la dernière phase de la pathogénèse, et effectuées comparativement sur le complexe et sur la virose seule.

En effet, au cours des travaux sur la pathogénèse (voir plus loin) il a été possible de définir dans l'évolution du complexe, un moment représentant le début de la généralisation de l'action virale sur l'ensemble du tissu adipeux. Ce moment s'est révélé assez constant et correspond aux premiers signes d'immobilité des larves. Entre ce moment et la mort des larves par speticémie, il s'écoule en moyenne 10 à 12 heures.

Dans les lots infectés avec le virus seul, les prélèvements de tissu adipeux effectués toutes les 24 heures, nous ont renseignés également sur le moment du début de généralisation de la virose. Le temps écoulé

à partir de là et jusqu'à la mort des larves par la virose (noté sur 50 individus) varie entre 4 et 10 jours à 22°C. avec une humidité relative de 70 p. 100.

La différence entre la durée de cette dernière période chez la virose seule et chez la virose associée à la septicémie nous paraît significative.

Elle semble fournir une explication d'abord en ce qui concerne la rareté de l'apparition simultanée dans une même population de la polyèdrie typique et de la polyèdrie doublée de septicémie.

Ensuite, elle permet de dégager une caractéristique essentielle du complexe qui est l'accélération du processus mortel de la virose par l'intervention de la septicémie secondaire. Cette dernière met un temps incomparablement plus court que la virose pour arriver à un stade mortel.

C'est par cette différence de rapidité que le complexe semble pouvoir se réaliser efficacement et que la maladie secondaire devient susceptible de masquer l'affection primaire.

Enfin, nous pensons pouvoir établir grâce à ces faits, un certain rapprochement entre ce complexe et le phénomène des « microbes de sortie » constatés en pathologie des Vertébrés et de l'Homme dans plusieurs maladies à virus. Citons ainsi l'exemple du virus grippal déclenchant l'apparition des bactéries hémoglobinophiles, la maladie de Carré préparant le terrain à *Bacillus bronchisepticus* et le virus de la peste porcine provoquant la sortie de *Salmonella suipestifer* et de certains *Pasteurella* (Levaditi, Lepine, Verge, 1943 ; Donatien, Lestoquard, 1929 ; Waldmann, 1930).

PATHOGÉNÈSE DU COMPLEXE

Après avoir montré par des recherches expérimentales sur *Bombyx mori*, la possibilité d'un rapport synergétique étroit entre la polyèdrie et une septicémie à *Bacterium paracoli*, et après avoir obtenu des renseignements sur l'ordre chronologique d'intervention de chaque élément pathologique, nous avons essayé de suivre macroscopiquement et microscopiquement le déroulement du complexe.

Pour avoir un aperçu sur les phases macroscopiquement visibles les plus caractéristiques, nous avons élevé individuellement (voir méthodes) 500 larves de *B. mori* (Race Roustan 200-300) infectées au début du troisième âge par administration d'un repas souillé de corps d'inclusions purifiés de *Borrelina* (1 000 éléments par mm^3) et de la culture (48 h) de *B. paracoli* (1 anse de colonie par 5 cm^3 d'eau). Les observations ont dû être fréquentes afin de pouvoir suivre l'évolution de la maladie dès les premiers signes d'affaiblissement. Chaque casier individuel a été visité toutes les 2 heures même pendant la nuit. Le changement d'observateur toutes les 12 heures a permis de continuer ainsi, pendant

5 jours, au moment de l'évolution maximum des affections. Le tableau III donne le résumé des observations en fonction du temps et sur une fraction des larves à l'étude. Les numéros manquants dans le tableau concernent les Vers non atteints par le complexe pendant la période de l'observation continue, la synergie ne se réalisant, comme montré plus haut, que rarement.

TABLEAU III

Évolution des symptômes externes du complexe « virose-septicémie » à partir du premier signe perceptible (Bombyx mori, 4e âge).

a : réflexes réduits. — b : mouvements ralentis. — c : immobilité fréquente. — d : immobilité e : relachement musculaire. — f : mort. — g : mélanisation.

Heures d'observation ininterrompue	Numéro de la larve en observation (t = 22 ± 0,5°C, H. R. = 70 ± 5 %)																		
	3	4	26	29	30	44	49	60	61	63	111	148	180	240	274	361	370	472	476	488
4	e																			
8	f																			
12												a			ab					
16										d	ab	d			d				d	
20										d	c	d			d				d	
24										d	c	d		a	f				f	
28			ab							f	d	c		b						
32			b								f	f		c						
36			b								g			e						
40			d																	
44			d											f						
48		ac	f			d														
52		d				d														
56		e				f														
60		e							c											a
64		f					a	a	d											b
68							d	a	e											b
72							f	b	f											b
76		g						d												f
80								d					c							g
84								d					e				ab	d		
88								f					f				c	e		
92					a												d	f		
96					bc												d			
100				a	d												e			
104				ab	d											ab	f			
108				d	d											c				
112				f	f											d				
116																e				
120				g																

Le premier fait important ressortant du tableau, réside dans l'homogénéité remarquable des symptômes quel que soit le moment de leur apparition. En effet, dans pratiquement tous les cas, le premier signe perceptible consiste en l'immobilité de la larve, cette dernière se déplaçant de moins en moins facilement. Parallèlement, un relâchement musculaire se produit, la larve s'allonge sur une surface, ou reste accrochée à une branche et meurt dans cette position. Un brunissement se produit alors, suivi de liquéfaction.

Cette période d'extériorisation se déroule en un temps relativement uniforme chez toutes les larves observées. Les limites entre le moment de l'apparition des premiers signes d'affaiblissement et la mort sont de 8 à 16 heures.

L'ensemble des symptômes macroscopiques caractéristiques se réduit donc à des signes extrêmement banaux, sans aucune spécificité, se rapprochant de ceux observés chez les Flacheries ou chez les « Wilt diseases ». L'aspect macroscopique de la maladie ne permet donc pas de conclure sur la nature des phases de la pathogénèse.

La deuxième étape de l'étude de la pathogénèse a commencé par des prélèvements de tissus adipeux, intestinaux et de sang à divers moments symptomalotogiquement définis. D'après l'examen microscopique de ces tissus, les signes intracellulaires de la virose consistant en l'apparition des corps d'inclusion polyèdriques, sont présents non seulement dans les larves mourantes mais dans toutes, quel que soit leur degré d'affaiblissement visible macroscopiquement. Ce fait dénote que les symptômes ne sont que des reflets tardifs de la pathogénèse. En tenant compte de l'évolution généralement lente du début d'une polyèdrie, une partie importante de la pathogénèse doit se dérouler sans aucune extériorisation.

De plus, même le diagnostic du début de la septicémie, c'est-à-dire la présence de *B. paracoli* dans l'hémolymphe, a pu être formulé à partir des prélèvements effectués dès les premiers symptômes macroscopiquement perceptibles. Ce fait montre que non seulement l'action virale précède les symptômes externes, mais encore que le complexe provoque des lésions qui se développent antérieurement aux modifications du comportement.

Compte tenu de ces précisions, l'étude histologique de la pathogénèse a été réalisée avant tout sur des larves fixées au moment où elles présentaient les premiers signes, même minimes, d'un affaiblissement. En effet, à ce stade, le premier caractérisé par des symptômes externes, on a également des lésions réduites donc discriminatives. Les images histopathologiques de 26 larves présentant une homogénéité remarquable, nous autorisent à considérer les lésions suivantes comme caractéristiques :

— Le tissu adipeux montre une légère hypertrophie partiellement liée à celle du cytoplasme, mais surtout à celle des noyaux.

— Ces derniers présentent des altérations morphologiques s'extériorisant par la coloration irrégulière de la chromatine.

— Le nucléoplasme contient des corps d'inclusions polyèdriques dont le nombre peut varier selon les cellules de 2 à plus de 30 ; en même temps de nombreuses cellules du même tissu paraissent exemptes de ces éléments.

L'ensemble de ces lésions caractérise la virose à polyèdres détaillée plus haut. Nous n'insisterons pas particulièrement ici sur les altérations

cytologiques, identiques à tous points de vue à celles observées lors de l'étude de la polyédrie seule. Précisons seulement que le nombre des lésions, semblable dans tous les cas examinés, définit un stade moyen de la virose correspondant au début de la généralisation.

La lumière intestinale remplie de débris de feuilles de mûrier mélangés au liquide gastrique, ne contient qu'un nombre réduit de microorganismes. On y retrouve régulièrement des bactéries dont la taille et la forme correspondent (compte tenu de l'effet du fixateur) à celle de la bactérie isolée des cas septicémiques. Ces bactéries sont surtout abondantes contre les cellules épithéliales des lobes méso-intestinaux. Cette localisation est cependant discontinue et réduite à certains points.

Nous n'avons pu déceler aucune lésion permettant de suivre la pénétration des bactéries à l'intérieur des cellules intestinales. En effet, le cytoplasme de ces cellules ne contient à ce stade que peu d'éléments bactériens. Par contre, ces derniers se retrouvent régulièrement dans la cavité générale, entre les tissus adipeux, musculaires et trachéaux. Précisons également que l'espace entre la membrane basale et l'épithélium intestinal en contient toujours un grand nombre. L'importance des bactéries dans la cavité générale varie beaucoup selon les individus examinés. Dans certains, cas on les décèle difficilement, tandis que dans d'autres, on les voit sous forme d'amas agglutinés (par l'effet de la fixation) dans diverses parties de la cavité générale.

Grâce à ces examens, nous avons saisi un moment de la pathogénèse du complexe, caractérisé simultanément par l'évolution moyenne d'une virose et par le début de l'établissement d'une septicémie bactérienne. Nous voyons que la virose représente dans le complexe l'affection la plus anciennement installée correspondant déjà à un syndrome interne.

Ces renseignements ont dû être complétés par d'autres, pris à un stade moins avancé de l'affection, afin de pouvoir trancher la question de la préexistence de la virose sans pathogénèse septicémique. Ils ont dû être complétés également par l'histopathologie de phases plus tardives de la maladie, afin de pouvoir caractériser certains stades intermédiaires et le syndrome de la septicémie. Il nous a semblé également nécessaire de voir dans quelle mesure la virose continue à jouer un rôle dans l'orientation secondaire de la pathogénèse.

Pour la série « précoce », 25 larves prélevées dans le même lot, mais ne présentant aucun signe d'affaiblissement ni de modification de couleur, contiennent sans exception dans leur tissu adipeux les corps d'inclusion de la virose (fig. nº 16). Dans certains cas, le nombre de polyèdres est réduit, dans d'autres, il est comparable à celui que nous avons relevé au moment du début de l'affaiblissement. Les tissus épidermiques et péri-trachéaux présentent également ces altérations ; quant aux autres organes, ils sont exempts de toute lésion cellulaire. Les éléments bacté-

riens se retrouvent dans la lumière intestinale mais sans accumulation autour des cellules épithéliales. Cette observation est valable également pour les signes d'action septicémique. En effet, dans la cavité générale,

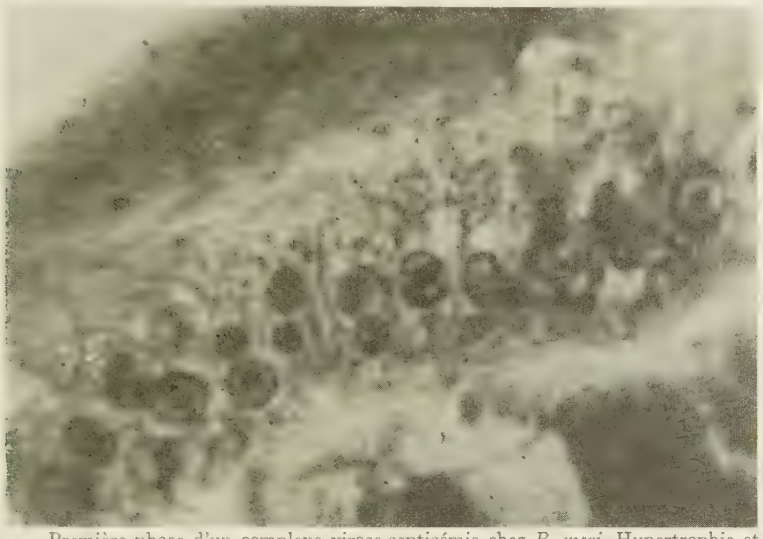


FIG. 16. — Première phase d'un complexe virose-septicémie chez *B. mori*. Hypertrophie et inclusions nucléaires réduites dans les cellules épidermiques caractérisant une virose faible à *Borrelina*. Hématox. Ferrique-Erythrosine. 1 : 400.

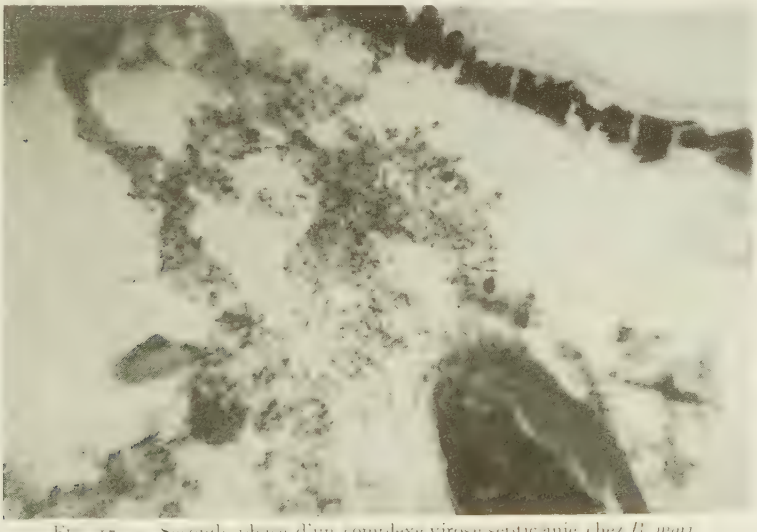


FIG. 17. — Seconde phase d'un complexe virose septicémie chez *B. mori*. agglomérats de *B. paracoli* dans la cavité générale. Hématox. Ferrique-Erythrosine 1 : 800.

chez certaines larves, on rencontre des bactéries peu agglomérées tandis que chez d'autres, elles sont complètement absentes.

La phase précoce du complexe semble donc consister en une évolution de l'affection viale et en la présence non obligatoire de bactéries

sur l'épithélium intestinal. On obtient ainsi une certaine discrimination relative à l'enchaînement progressif de deux sortes d'altérations et à l'indépendance primaire de la virose simple.

L'examen d'échantillons en état de maladie plus avancée (affaiblissement prononcé des chenilles précédant la mort), nous a révélé chez la totalité des chenilles (25) l'abondance d'éléments bactériens dans la cavité générale. Ils sont également très nombreux entre les lobes du tissu adipeux et les segments du tissu musculaire. La structure de ce dernier tissu subit un relâchement surtout vers la périphérie. Le syndrome final du complexe peut être ainsi défini histologiquement comme une septicémie typique (fig. nº 17).

A cet ultime stade de la maladie, les bactéries continuent à se multiplier activement dans les cellules intestinales et dans la lumière de l'intestin rempli de feuilles en voie de digestion. Déjà à ce moment, sont visibles les signes de certaines altérations fonctionnelles se rapprochant du processus « post mortem ».

La comparaison des lésions définies à divers stades de l'évolution de la maladie, permet de reconstituer un processus pathologique suivant l'ordre chronologique des actions pathogènes.

Les premières altérations sont nettement celles d'une virose à polyèdres. Cette affection évolue sans aucun signe d'intervention d'autres éléments, jusqu'à un stade où les altérations des tissus atteints entrent dans la phase de généralisation. C'est à ce moment là, qu'une infiltration d'éléments bactériens est observée avec multiplication progressive de ceux-ci dans la cavité générale. D'après la cytologie du tissu intestinal effectuée à ce moment critique, cet envahissement est difficilement attribuable à un seul affaiblissement des cellules épithéliales intestinales facilitant l'infiltration (semblant d'ailleurs extra-cellulaire). Il est plutôt dû en grande partie à la lyse tissulaire en voie de généralisation dans la cavité générale, ce qui permet une multiplication moins inhibée des éléments bactériens même très rares en contact avec l'hémolymphe.

A partir de ce moment là, les lésions virales passent au second plan, bien qu'elles continuent à évoluer vers le syndrome « virose généralisée ». C'est l'évolution plus rapide de la septicémie qui fait dévier le processus et crée le syndrome mortel définitif consistant en une septicémie à *B. paracoli*.

CONCLUSIONS

Partant de la recherche des facteurs favorisant l'apparition chez les Lépidoptères des septicémies à bactéries facultativement pathogènes, nous avons montré les rapports étroits existant entre ces maladies et des viroses inapparentes.

Les études successives décrites dans ce chapitre ont défini d'abord la virulence réduite « per os » de certaines souches bactériennes agents de septicémies et l'évolution des lésions virales sans extériorisation.

Les expériences destinées à dégager les facteurs favorisant une septicémie à *B. paracoli* ont montré le rôle réel d'une infection virale préalable à *Borrelina bombycis*. D'après l'étude de la pathogénèse, le lien entre les deux affections consiste en l'évolution primaire de la virose sur laquelle se greffe au début de la généralisation des lésions, une accumulation bactérienne venant du tube digestif. Les bactéries déterminent une septicémie rapide qui évolue pendant le dernier stade de la maladie et met un terme à celle-ci par l'action léthale.

L'ensemble de ces actions pathologiques se présente ainsi sous forme d'une entité composée d'une succession de lésions. Le début de la série faisant partie d'une pathogénèse virale et la partie suivante d'une bactérémie, nous considérons cet ensemble comme l'enchaînement de deux affections. Toutes les deux étant de nature parasitaire, l'enchaînement est conditionné par la présence de deux agents pathogènes. La coïncidence de cette double présence est la condition « sine qua non » de la formation du complexe, et c'est dans celle-ci que doit être recherchée une explication de la génèse de cet enchaînement au point de vue épizootique. D'après la nature des liens entre les processus pathologiques, il nous semble possible d'envisager qu'une épizootie de septicémie puisse en réalité n'être qu'une épizootie de virose suivie de complications.

La désignation de « complication » de septicémie définit bien notre pensée en ce qui concerne la considération de cet enchaînement au point de vue pathologie comparée. Nous voyons ici certaines analogies avec l'apparition des « microbes de sortie » observés en pathologie humaine et des Vertébrés, notamment dans le cas de la grippe, de la peste porcine, etc...

Enfin, ce cas d'enchaînement montre qu'un syndrome peut masquer entièrement une autre affection plus puissante, sans la préexistence de laquelle il ne pourrait pas se développer. Ce fait a des conséquences, notamment pour les caractérisations pathologiques, car il met en évidence, que le diagnostic de septicémie n'est pas toujours suffisant pour définir entièrement une maladie présentant ce syndrome.

CHAPITRE V

COMPLEXE BLESSURE — INFECTION MICROBIENNE

HISTORIQUE DE LA MISE EN ÉVIDENCE DU COMPLEXE

Parmi les cas spontanés d'infections cryptogamiques et bactériennes constatés par nous depuis 1946 sur divers Insectes, certains ont paru être en contradiction avec la virulence des souches isolées. En effet, à plusieurs reprises les taux importants de mortalité ne semblaient pas en rapport avec la virulence assez limitée des souches causales facultativement parasites, comme par exemple celles du groupe *ochraceus* des *Aspergillus* ou certains *Spicaria* du type *fumoso rosea*. De plus, nous avons souvent pu établir le diagnostic « mycose localisée à évolution léthale » chez des larves de Coléoptères provenant de diverses régions de France et d'Autriche et chez lesquelles les isolements n'ont pu mettre en évidence que des espèces cryptogamiques à virulence réduite comme par exemple certains *Fusarium*.

Aucun détail pathologique ou histologique ne pouvait expliquer ces sensibilités inhabituelles. Seuls des signes de mélanisation cutanée indiquant une blessure hémorragique se sont montrés remarquablement constants dans tous les cas. Ce fait, ainsi que la correspondance fréquente des taches mélanisées avec les foyers cryptogamiques localisés, nous ont fait de plus en plus envisager l'étude des relations entre blessure et infection.

Dans la littérature entomologique sont cités quelques cas de mort d'Insectes à la suite d'infections survenues après blessures. STEINHAUS dans sa mise au point (1949 b) sur les travaux de pathologie des Insectes, mentionne (p. 17) que d'une façon générale les blessures peuvent faciliter les infections microbiennes. D'après NORTHRUP (1914 a, b) l'évolution des infections à *Micrococcus nigrofaciens* NORTH. est hâtée par des parasitismes ou des traumatismes. TAUBER (1940) suppose que le *Micrococcus pyogenes albus* (ROS.) pénètre vraisemblablement dans la cavité générale de *Blatta orientalis* L. par le tégument facilement lésé après la mue. STUTZER et WSOROW (1927) ont obtenu l'infection artificielle d'*Euxoa* par *Pseudomonas septica* BERGEY en incisant le tégument en présence de matière virulente. Les adultes de *Blissus leucopterus* (SAY) affaiblis ou blessés sont, d'après SNOW (1896) plus réceptifs vis-à-vis de *Beauveria globulifera* (SPEG.) que les exemplaires sains.

De telles données montrent d'abord que la possibilité d'un rapprochement entre blessures et maladies microbiennes, n'a pas échappé

aux auteurs. Mais en même temps, le fait que ces données ne se trouvent que sous forme de remarques, ou de simples allusions dans des travaux traitant d'autres questions, montre que ni l'étude des processus, ni les considérations d'un rapport entre blessure et infection n'ont été envisagées.

Dans l'ensemble de ce travail, nous avons recherché le mécanisme du complexe dans lequel la blessure est considérée comme premier processus pathologique et l'infection survenue par suite de celui-ci comme une seconde phase. Les phénomènes pathologiques spontanés sur lesquels nos observations de départ ont été faites appartiennent aussi bien aux bactérioses qu'aux mycoses et aux viroses. Au point de vue blessure, ils se rattachent aux types : frottements épidermiques, coupures superficielles, coupures hémorragiques, piqûres et morsures.

Parmi ces observations faites dans la nature trois exemples types seront présentés portant sur des larves de *Cetonia aurata* L., *Melolontha melolontha* L. (*Coleoptera*) et sur celles de *Sesamia nonagrioïdes* Lef. (*Lepidoptera*).

1° Blessure cutanée et mycose à *Metarrhizium anisopliae* (Metch.) Sor. sur larves de *Cetonia aurata* L.

Parmi les larves récoltées en 1950, 1951 et 1952 à St-Christol les Alès (Gard), à Montpellier (Hérault) et à Uzès (Gard) dans des tas de terreau plusieurs présentaient des plaies cutanées mélanisées à divers endroits de la cuticule. Elles furent conservées individuellement dans des récipients d'isolement contenant du terreau de St-Christol 48 à 180 heures plus tard, leurs mouvements devinrent ralentis et leurs réflexes diminuèrent. Après prise d'hémolymphe dans les segments terminaux et postcéphaliques ainsi que sur celui portant la plaie, les Insectes furent fixés dans le Bouin pour examens histopathologiques. Ceux-ci ont donné les constantes suivantes :

Après coloration au Pappenheim et au Wright, les frottis sanguins présentent une leucocytose avec prédominance des micronucléocytes. Le cytoplasme des globules a une structure relâchée, avec tendance à l'éosinophilie.

On observe en dehors des hémocytes, des éléments larges, souvent ovoïdes, fortement vacuolisés ayant 1-1,5 µ sur 2,5-3,5 µ environ. Ils correspondent aux fragments mycéliens que l'on rencontre régulièrement dans l'hémolymphe, au début de la phase de généralisation des mycoses, avant que les filaments mycéliens ne se développent au contact des tissus.

L'étude histopathologique a été envisagée sur rubans ininterrompus de coupes. A l'exception d'une vingtaine de coupes par larves qui ont été colorées à l'hémalun-éosine-orange et suivant Prenant et Kull pour mettre éventuellement en évidence les altérations intra-cellulaires, le reste des préparations a été traité à l'hématoxyline ferrique combinée

avec érythrosine. Cette technique accentue les éléments mycéliens même à l'intérieur d'un tissu.

Toutes les sections de la tête sont exemptes d'altérations morphologiques et il n'existe pas d'éléments étrangers par rapport aux larves de *Cetonia* saines.

Sur les segments portant les taches, le changement de couleur de la cuticule tirant du jaune foncé au brun presque noirâtre, définit d'une façon nette l'emplacement d'une blessure. Ces altérations se superposent aux points de rupture de la continuité des cellules de l'épiderme.

Dans la cavité générale, aux endroits les plus proches des lésions, le nombre de fragments mycéliens augmente considérablement. D'une façon générale, au contact des points de rupture de l'épiderme, ces éléments cryptogamiques se touchent.

La couche chitineuse est également le siège de pénétrations cryptogamiques. En effet, des filaments mycéliens parallèles à cette couche sont visibles à l'intérieur de la chitine ; en nombre important autour du foyer ; ils sont plus rares à mesure que l'on s'éloigne de celui-ci. On note également la présence d'un plus grand nombre d'hémocytes à proximité de la lésion cutanée que dans les autres parties de la cavité générale.

Les cultures d'isolement effectuées à partir des prises d'hémolymphe confirment et complètent les constatations histologiques relatives au rôle d'un cryptogame. Les ensemencements des milieux Sabouraud glucosé, pomme de terre et carotte gélosées à l'extrait d'œufs de *Bombyx*, et gélose malt, donnent naissance dans les cas correspondant à la description histopathologique ci-dessus, à des cultures pures de *Metarrhizium anisopliae* (Metch.) Sor. ou d'*Aspergillus melleus* Yuk. et dans d'autres cas à celles des *Beauveria*. Ces espèces microbiennes sont connues comme agents pathogènes de mycoses chez divers Insectes, et notamment chez les larves de Coléoptères (Metchnikoff, 1879 ; Glaser, 1926, etc...)

L'ensemble de ces observations montre, d'une part, les signes anatomiques et histologiques d'une discontinuité de la couche chitineuse et de l'épithélium, avec mélanisation de l'hémolymphe sur ce même point, donc les caractéristiques histopathologiques d'une blessure cutanée profonde.

D'autre part, la localisation du mycélium d'un champignon pathogène à l'entrée des lésions cutanées et la diminution importante des éléments mycéliens dans les autres parties de la cavité générale ou de l'épiderme laissent supposer l'existence d'un rapport avec le phénomène précédent, rapport consistant en la fixation du cryptogame consécutivement à la blessure.

Sachant par de nombreux exemples, que les fragments de mycélium de *M. anisopliae*, de *A. melleus* ou des *Beauveria* circulant dans l'hémo-

lymphe amènent quasi obligatoirement une mycose généralisée des larves de *C. aurata* L., nous pouvons dire que les processus décrits auraient obligatoirement évolué en affections mortelles au bout de 48 à 120 heures.

IG. 18 Coupure cutanée et infection secondaire à *Metarrhizium anisopliae* sur larve de *Melolontha melolontha*.

FIG. 19. — Morsure (par une autre larve) et infection secondaire à *Aspergillus ochraceus* sur larve de *Melolontha melolontha*.

Il semble donc bien s'agir de l'enchaînement d'un complexe à deux phases.

2° Frottements cutanés et mycose saprophytaire à *Fusarium poae* (PH.) WR. sur larves L3 de *Melolontha melolontha* L.

lymphe amènent quasi obligatoirement une mycose généralisée des larves de *C. aurata* L., nous pouvons dire que les processus décrits auraient obligatoirement évolué en affections mortelles au bout de 48 à 120 heures.

FIG. 18. — Coupure cutanée et infection secondaire à *Metarrhizium anisopliae* sur larve de *Melolontha melolontha*.

FIG. 19. — Morsure (par une autre larve) et infection secondaire à *Aspergillus ochraceus* sur larve de *Melolontha melolontha*.

Il semble donc bien s'agir de l'enchaînement d'un complexe à deux phases.

2° Frottements cutanés et mycose saprophytaire à *Fusarium poae* PH.) WR. sur larves L3 de *Melolontha melolontha* L.

Ce type pathologique a été rencontré fréquemment chez les larves de ce Coléoptère, provenant du Languedoc et des Pyrénées. Il consiste soit en une mélanisation cutanée uniforme et étendue sur une surface de plusieurs dizaines de mm^2, soit en taches blanches cotonneuses aux contours rougeâtres et de dimensions semblables. Nous soulignons que ces altérations sont presque exclusivement localisées sur le milieu du dos des larves, à l'endroit le plus recourbé. L'examen microscopique de cette surface à la lumière réfléchie, permet de reconnaître que les taches noires correspondent à la mélanisation de la couche chitineuse observée habituellement aux bords des blessures cutanées, mais ne met pas en évidence une coupure nette. En même temps, un contraste de la surface noire avec la peau saine s'établit par le fait que non seulement les poils sont inexistants sur la première, mais de plus les points de pénétration de ces poils, normalement bien délimités, sont presque complètement effacés.

Déjà, ces examens macroscopiques ou à faible grossissement permettent de s'orienter sur la nature des lésions. Le fait de la localisation sur l'endroit le plus recourbé du corps fait penser à un frottement. La disparition des poils et des détails superficiels de la couche chitineuse, ainsi que l'étendue de la mélanisation sans coupure ne font que confirmer cette façon de voir.

Avec le même procédé d'examen, on décèle sur la surface mélanisée un mycélium blanc à structure légère dont les filaments sont aplatis contre la chitine. En dehors de la surface mélanisée ce mycélium est toujours absent (Tableau IV).

TABLEAU IV

Localisation du mycélium cryptogamique sur larves de M. melolontha *après blessure par frottement.*

	Échantillons de larves					
	Rouen 211	Lasalle 1	Nîmes 47	Colmar 7	Nîmes 49	Nîmes 57
Sur chitine mélanisée	+	+	+	+	+	+
Limite chitine mélanisée et saine	+	—	—	—	+	—
sur chitine saine	—	—	—	—	—	

Les examens histopathologiques des préparations colorées selon MALLORY et à l'hématoxyline ferrique montrent une large stratification de la couche chitineuse. La mélanisation ne pénètre pas jusqu'à la base de cette couche contrairement à ce qui se passe lors de la mélanisation des coupures chez lesquelles le brunissement traverse sur le point de

la blessure toute la chitine. Le deuxième détail important, semble résider dans la conservation de la continuité du tissu épithélial ce qui confirme indirectement la nature superficielle des lésions cutanées. Cependant,

FIG. 20. — Frottement dorsal et infection secondaire à *Fusarium Poae* sur larve de *Melolontha melolontha*.

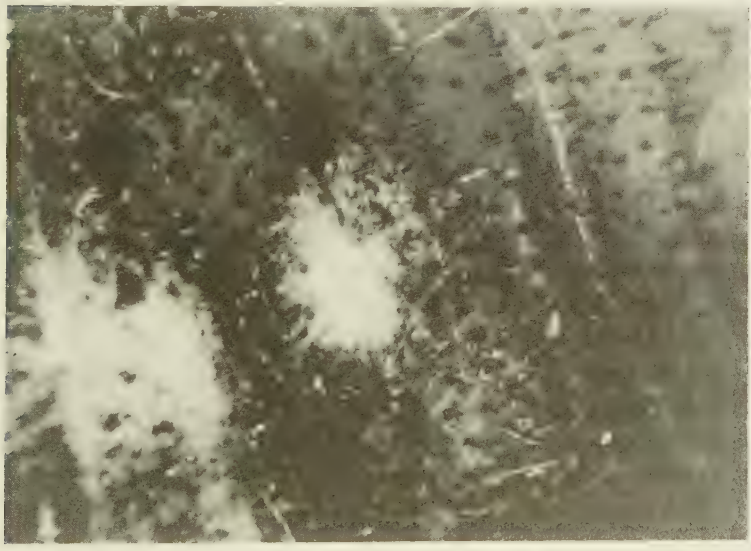


FIG. 21. — Plaie en voie de guérison avec Mycelium Cryptogamique sur le même cas.

il faut souligner que les cellules épidermiques situées sous la surface mélanisée attestent une irrégularité de taille et de forme, ce qui dénote un dérangement en profondeur. L'augmentation importante du nombre

des hémocytes autour des parties lésées montre une ressemblance avec ce qui s'observe à ce sujet chez une blessure profonde.

Collées sur la surface externe de la chitine, les touffes mycéliennes se dégagent nettement surtout avec la coloration de MALLORY qui différencie les filaments cryptogamiques en rouge clair sur la chitine bleu vif.

Il est possible de suivre, en plusieurs endroits de la surface mélanisée, la pénétration des fragments mycéliens. Cette traversée de la chitine ne se confond pas, à cause de la position caractéristique des éléments, avec celle qui se produit pour la sortie des filaments après une mycose généralisée. Au niveau du tissu épidermique correspondant à la surface mélanisée, les fragments mycéliens sont accumulés dans la cavité générale. La diminution du nombre de ces éléments dans les autres parties de la cavité, est bien plus marquée que dans les cas précédents, ce qui caractérise la nature peu parasitaire du cryptogame envahisseur.

Ces derniers ont été isolés de plusieurs larves atteintes. Nous ne mentionnons ici, que l'un des plus répandus : le *Fusarium poae* (PH.) WR. que nous avons retrouvé dans 11 cas de lésions cutanées.

En dehors des images histopathologiques de l'accumulation mycélienne sur les lésions traumatiques, le fait de voir un cryptogame normalement apathogène se développer dans les larves blessées et tuer ces dernières, nous a incité à voir ici une succession des deux processus et à envisager l'étude du complexe.

3° Coupure cutanée et bactériose à *B. paracoli aerogenoïdes* sur larves de *Sesamia nonagrioïdes* LEF. (*Lepidoptera*).

De nombreuses larves de ce Lépidoptère provenant des régions d'Avignon, d'Alès et de Montpellier, présentaient des taches noires plus ou moins étendues. L'histologie montre que certaines de ces taches ne sont que superficielles, tandis que d'autres constituent des altérations en profondeur dans la cuticule chitineuse, avec traces visibles de traumatismes.

Dans beaucoup de cas, les larves ne semblent subir aucune conséquence de ces lésions et peuvent être maintenues en élevage pendant plusieurs semaines.

Cependant, certains Insectes avec taches semblables perdent leur turgescence et subissent un relâchement musculaire, puis se maintiennent pendant plusieurs jours dans cet état et meurent après immobilisation progressive.

Dans l'hémolymphe de ceux qui sont très affaiblis, nous avons toujours retrouvé, par examen des frottis et par isolements sur milieux gélosés, les signes d'une septicémie bactérienne. L'espèce bactérienne responsable variait peu selon les cas : en dehors des infections à bactéries sporogènes, le plus souvent le *Bacterium paracoli* du groupe *aero-*

genoïdes a été obtenu en culture pure (1). L'infection était toujours accompagnée d'une réaction phagocytaire, ainsi que d'une lyse partielle.

L'histopathologie permet de caractériser une affection septicémique avec accumulation du germe dans les espaces intertissulaires. Dans la majorité des cas, il n'a pas été possible de mettre en évidence un groupement d'éléments bactériens à proximité des lésions cutanées mélanisées, la répartition dans la cavité générale étant assez homogène. Cependant chez 3 larves, nous avons observé sur 3 ou 4 coupes traversant exactement le point des lésions traumatiques, des bactéries collées en « nids » contre la limite de la couche chitineuse lésée et des cellules épithéliales déplacées. Dans les mêmes exemplaires il n'y avait que de très rares bactéries intertissulaires dans la cavité générale.

Dans ce cas, il est infiniment plus difficile que pour les infections cryptogamiques d'établir une suite dans les processus pathologiques. Néanmoins, la présence de caractères histologiques nets de lésions traumatiques traversant les couches chitineuses et épidermiques, fait supposer que la septicémie bactérienne a été précédée par les lésions.

*
* *

L'analyse de chacun des cas spontanés décrits ci-dessus nous a permis de reconnaître l'existence d'une succession d'affections pathologiques et notamment de lésions cutanées et d'infections microbiennes. D'après les caractères histopathologiques, ces affections semblent avoir des rapports étroits que nous avons tenu à rechercher expérimentalement.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DES RAPPORTS ENTRE BLESSURES ET INFECTIONS ULTÉRIEURES

La reproduction expérimentale de la succession des deux facteurs a été envisagée en créant artificiellement les lésions traumatiques et en apportant ensuite sur celles-ci, une suspension de cultures pures de différents microorganismes pathogènes ou parasites facultatifs. Ces expériences ont porté sur des groupes de cryptogames, de bactéries et de virus. Les traumatismes et les infections ont été réalisés sur divers Insectes ; ici seront seulement décrits les essais concernant les larves de *Bombyx mori* L.

Afin de simplifier les facteurs en jeu, un même type de lésions traumatiques a été adopté dans tous les cas : la blessure hémorragique cutanée.

La technique employée pour l'obtention de ces lésions, a été différente selon l'âge des larves. Chez les larves des 2e et 3e âges, la chitine

(1) Nous remercions le Docteur BUTTIAUX pour l'étude du germe.

est traversée par une aiguille en acier ayant un diamètre de 3/10 mm. La profondeur des lésions est fixée à 1mm à l'aide d'un arrêt marqué sur l'aiguille et obtenu en trempant cette dernière dans une solution de métacrylate de butyle monomère préalablement additionnée de péroxyde de benzoïde. La polymérisation de cette matière plastique est obtenue à 40°C et le bout de l'aiguille reste dénudé sur une longueur de 1 mm. Pour les larves plus volumineuses (5^{e} âge) l'épiderme étant plus résistant, la blessure est réalisée par coupure d'une surface ovale de 1 mm de long, à l'aide de ciseaux à micro-dissection avec lames recourbées de 3 mm de longueur. Grâce à cette technique, la plaie peut être obtenue avec une régularité remarquable, sur le milieu des segments, aux points les plus convexes de ceux-ci en opérant sous loupe binoculaire.

L'infection est pratiquée 30 minutes après la blessure, avec une suspension en eau stérile, de la culture pure du microorganisme adopté, à raison d'environ 1 mm^{3} de culture pour 5 cm^{3} d'eau. Pour le virus de la polyèdrie, nous avons purifié les corps d'inclusion à partir de l'hémolymphe fortement virosée de *B. mori*, à l'aide de centrifugations à 6 000 t/m alternées d'homogénéisations. Ces corps ont été remis en suspension, dans une quantité d'eau physiologique correspondant à 5 fois la quantité d'hémolymphe prélevée.

Tous les essais sont semblables :

Quatre lots d'égale importance sont formés avec des larves du même âge, provenant d'une même population. Deux d'entre eux représentent les fractions du complexe.

La répartition des lots est la suivante :

a) sans traitement,

b) traumatisme seul,

c) infection seule sur épiderme non lésé,

d) traumatisme et infection.

Les microorganismes mis en contact avec la blessure, sont chosis parmi les souches très pathogènes et moyennement actives, ainsi que parmi celles saprophytes pour *B. mori*.

Les cryptogames *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. et *Beauveria effusa* (Beauv.) Vuill. sont des espèces pathogènes vis-à-vis d'un grand nombre de Lépidoptères (Arnaud, 1927 ; Metalnikov, Toumanoff, 1928 ; Paillot, 1930 ; Lefebvre, 1931). Introduits par la voie alimentaire leur action entomophyte généralisée et rapide s'extériorise par la formation de conidies blanches-jaunâtres à la surface de l'hôte. Le *Metarrhizium anisopliae* (Metch.) Sor. à couches de conidies verdâtres, est également l'un des cryptogames reconnus comme des plus virulents vis-à-vis des Insectes. Quant à la gamme des espèces réceptives elle est encore plus étendue que pour les cryptogames précédents (Metchni-

KOFF, 1879 ; KRASSILSTSCHIK, 1888 ; GLASER, 1926 ; WALLENGREN, JOHANSON, 1929).

Le *Rhizopus niger* CIAG, HEW. peut être considéré comme un saprophyte banal avec une certaine affinité malgré tout vis-à-vis des Coléoptères et des Lépidoptères, car nous avons souvent isolé ce champignon non seulement des cadavres de *Bombyx mori* L, de *Thaumetopoea processionea* L. de *Melolontha melolontha* L. et de *Tenebrio molitor* L., morts de causes autres, mais également de larves très affaiblies. Nous avons tenu compte des différences importantes qu'ont présenté les souches diverses de cette espèce au point de vue affinité vis-à-vis des Insectes.

Par contre, le *Penicillium granulatum* BAIN. représente dans cette série d'essais, l'espèce fréquente sur Insectes, sans action pathogène par voie buccale et très peu par inoculation.

Enfin, le *Fusarium coeruleum* (LIB) SACC. a toujours été isolé de l'intestin ou de la surface extérieure des *Bombyx, Tineola, Tipula, Melolontha, Rhizotrogus sp.* sans que l'on ait jamais remarqué d'action pathologique.

De même chez les bactéries, la souche « *alesti* » de *Bacillus cereus* FRANKL et FRANKL appartenant au groupe pourvu de cristalloïdes intracellulaires, est hautement pathogène « per os » et par injection vis-à-vis de plusieurs Lépidoptères. Le degré de son action toxémique ou septicémique varie selon les espèces hôtes (VAGO, 1951 a) ; TOUMANOFF, VAGO, 1951, 1952).

Pour la bactérie asporogène *Bacterium paracoli* GILB. et LION. protéolytique, seule l'action septicémique a été démontrée chez plusieurs Lépidoptères tels que *Sesamia cretica* LD., *S. nonagrioïdes* LEF., *Thaumetopoea processionea* L. et *T. pityocampa* SCHIFF. Généralement elle déclenche une réaction phagocytaire importante. Le *Pseudomonas septica* BERGEY cause couramment des septicémies surtout parmi les jeunes larves des Coléoptères souterrains mais il s'est également montré virulent pour *Deilephila euphorbiae* L. Il provoque une phagocytose assez marquée et produit dans l'hémolymphe un pigment à fluorescence jaune vif. Le *Serratia marcescens* BIZIO a également une action septicémique mais bien moins marquée que chez l'espèce précédente. La formation de pigments rouges ne se manifeste qu'à un stade très avancé de la maladie ou à un stade « post mortem ».

Enfin, une souche *Bacillus megatherium* DE BARY entièrement inactive « per os » vis-à-vis de *B. mori, Pieris brassicae* L., *Sesamia nonagrioïdes*, etc..., a été aussi incluse dans la série.

Pour le groupe des virus, les essais n'ont pu porter que sur un seul agent pathogène. En effet, bien que la spécificité des virus d'Insectes vis-à-vis des espèces hôtes soit assez discutée à l'heure actuelle (SMITH, XEROS, 1953) il était indiqué d'expérimenter avec un virus susceptible

de déclencher normalement et avec une probabilité élevée une virose. Pour *B. mori*, on n'en connaît qu'un à l'heure actuelle : *Borrelina bombycis* PAIL., agent d'une polyèdrie. Il se conserve à l'intérieur de corps

FIG. 22. — Larve de *Melolontha melolontha* L. sortant de mue 33 jours après blessure cutanée. L'exuvie porte les parties lésées mélanisées, en voie de guérison. La larve ne présente plus de signes pathologiques.

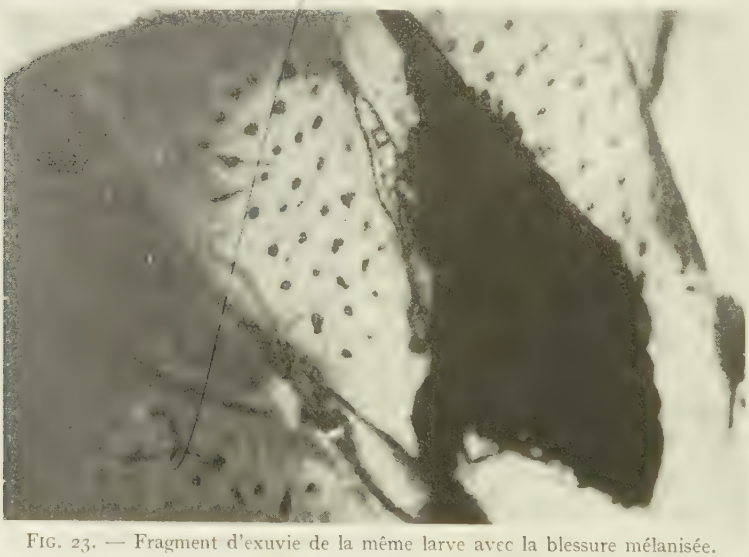


FIG. 23. — Fragment d'exuvie de la même larve avec la blessure mélanisée.

d'inclusion pseudocristallins et la voie normale de l'infection est le passage de ces corps dans le tube digestif.

Les figures 23, 24, 25 résument l'évolution de la mortalité de chaque série. Elles donnent les totaux journaliers des cas reconnus par examens

de déclencher normalement et avec une probabilité élevée une virose. Pour *B. mori,* on n'en connaît qu'un à l'heure actuelle : *Borrelina bombycis* PAIL., agent d'une polyédrie. Il se conserve à l'intérieur de corps

FIG. 22. — Larve de *Melolontha melolontha* L. sortant de mue 33 jours après blessure cutanée. L'exuvie porte les parties lésées mélanisées, en voie de guérison. La larve ne présente plus de signes pathologiques.

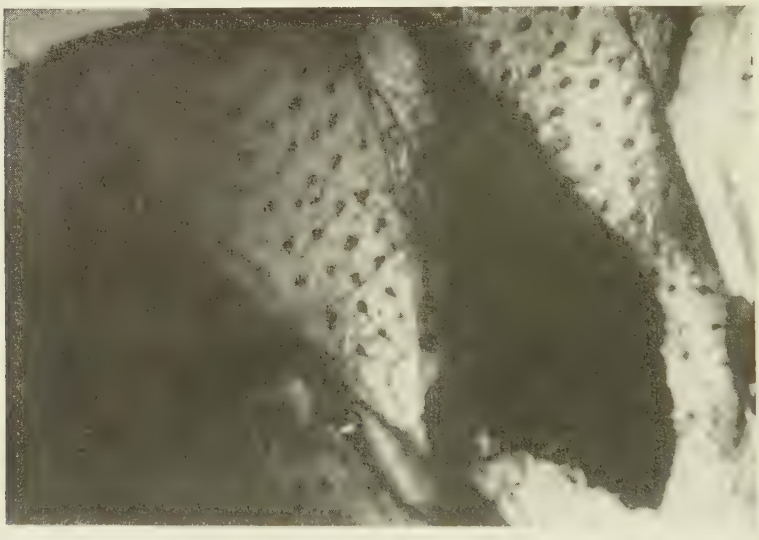


FIG. 23. — Fragment d'exuvie de la même larve avec la blessure mélanisée.

d'inclusion pseudocristallins et la voie normale de l'infection est le passage de ces corps dans le tube digestif.

Les figures 23, 24, 25 résument l'évolution de la mortalité de chaque série. Elles donnent les totaux journaliers des cas reconnus par examens

pathologiques, comme étant dus aux affections correspondant à l'effet des microarganismes utilisés pour chacune des expériences. Ces chiffres portent sur des lots d'essais de 100 individus chacun, élevés et traités individuellement.

Sans traitement, les larves ne présentent que rarement les infections dues aux germes employés pour une expérience donnée ; en effet, ces

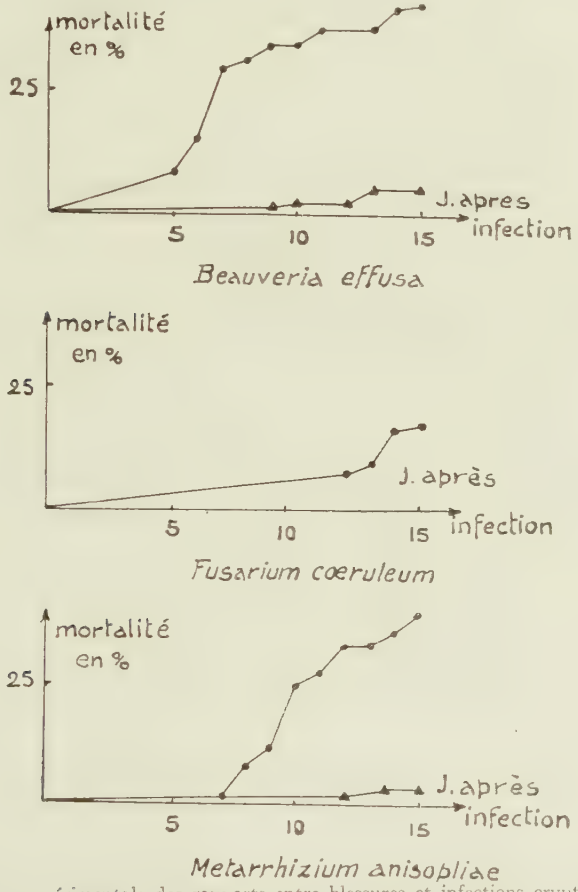


FIG. 24 — Analyse expérimentale des rapports entre blessures et infections cryptogamiques. Mortalité des larves de *Bombyx mori* L. avec diagnostics pathologiques. ▲ infection sur épiderme intact. — ● infection après blessure.

germes peuvent être, à l'exception du virus *Borrelina bombycis*, évités au cours des élevages expérimentaux.

Les blessures sans infection provoquent une faible mortalité due surtout aux hémorragies ; mais dans la grande majorité des cas, une mélanisation suivie d'un dessèchement puis d'une cicatrisation succèdent aux lésions.

L'infection de la peau saine, n'a de conséquences qu'avec certains

cryptogames très pathogènes, tels que les *Metarrhizium* et les *Beauveria*, susceptibles de pénétrer à travers la cuticule intacte et de provoquer une mycose.

Les blessures suivies d'infections se comportent de façons diverses. Après infection par le cryptogame *Metarrhizium anisopliae*, une mélanisation de la blessure commence et progresse de la même façon qu'après

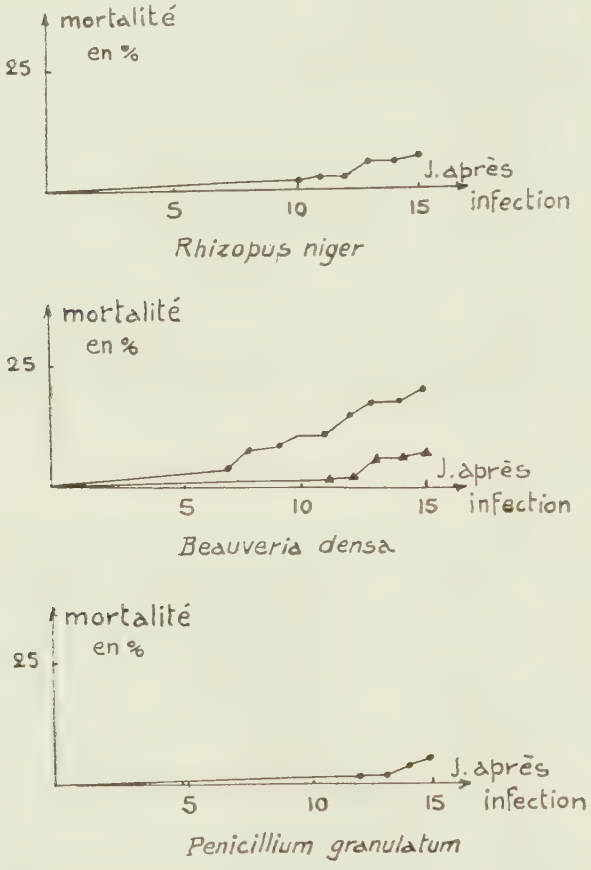


Fig. 24. — Analyse expérimentale des rapports entre blessures et infections cryptogamiques (*suite*).

une blessure non infectée. Plus tard cependant, la mélanisation s'étend au-delà des limites de la guérison. Bien qu'un développement externe du mycélium sur la lésion ne soit pas toujours visible, une mycose généralisée se produit dans plus de 50 p. 100 des individus. Avec *Beauveria densa*, la lésion ne présente pas de mélanisation exagérée comme dans le cas précédent, mais une mortalité par mycose se produit dont l'importance reste d'ailleurs inférieure à celle de la précédente. Pour *Beauveria effusa*, les mêmes remarques sont valables. Dans les deux cas, les larves

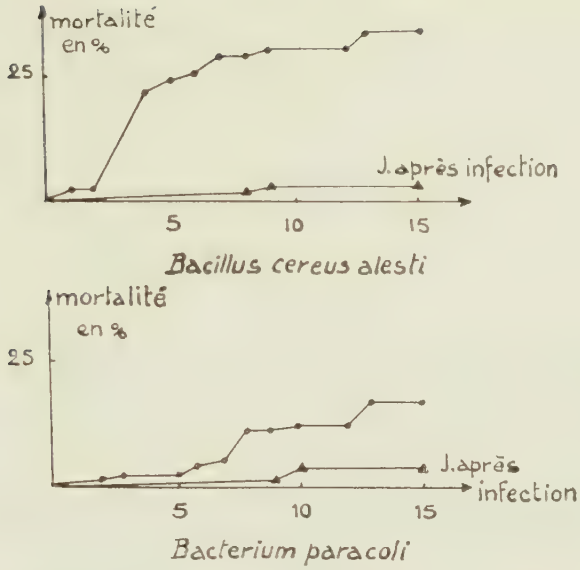


FIG. 25. — Analyse expérimentale des rapports entre blessures et infections bactériennes. Mortalité des larves de *Tenebrio molitor* L. avec diagnostics pathologiques. ▲ infection sur épiderme intact. ● infection après blessure.

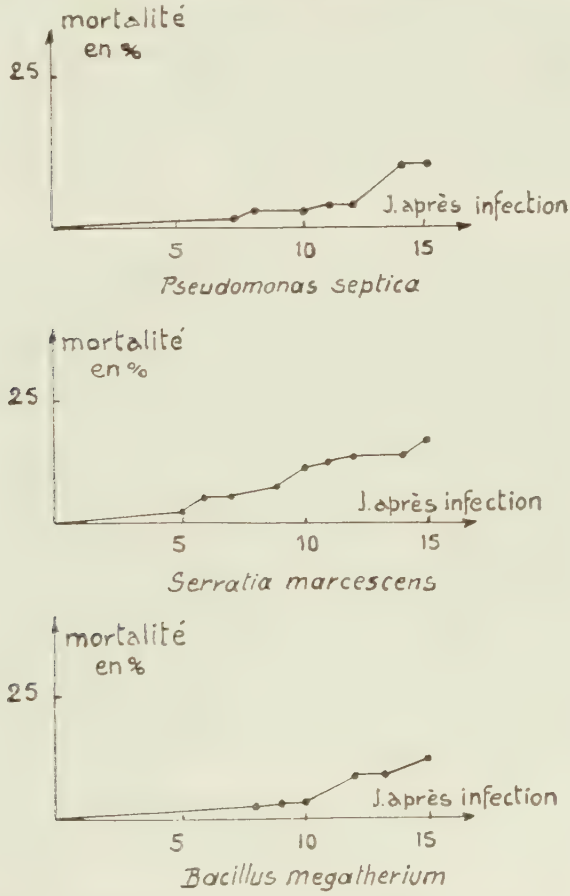


FIG. 25. — Analyse expérimentale des rapports entre blessures et infections bactériennes (*suite*).

meurent au bout de 3 à 10 jours avec signes d'affaiblissement préalables très réduits.

Les deux champignons *Penicillium granulatum* et *Rhizopus niger* normalement très peu virulents vis-à-vis des larves de *B. mori*, créent des foyers locaux sur le tissu mélanisé lui-même mais n'amènent ni l'un ni l'autre une mycose comparable à celles provoquées par les espèces pathogènes. Les Vers s'affaiblissent progressivement et les champignons ne gagnent les organes que lentement. Le processus se termine par mycose des larves atrophiées. Signalons que grâce à des essais préliminaires et compte tenu des variations importantes d'affinité chez *R. niger*, nous avons choisi l'une des souches les plus actives sur plaies.

Le cryptogame *Fusarium coeruleum*, dépourvu de toute virulence pour *B. mori* aussi bien par contact que par voie alimentaire, provoque des foyers localisés sur les plaies et en s'étendant entraîne une atrophie mortelle. La larve est ensuite envahie par le même champignon en raison d'une action saprophytaire.

Parmi les bactéries étudiées, la souche *alesti* de *Bacillus cereus*, peut se fixer sur les lésions préalables et réalise souvent des septicémies secondaires, bien que dans la maladie spontanée ce germe ne soit un agent de septicémie que chez les Insectes d'abord paralysés par son action toxique. Par contre, le *Bacterium paracoli* protéolytique, agent typique de septicémie chez certains Lépidoptères, bénéficie faiblement des lésions pour le déclenchement d'une pathogénèse.

Le *Pseudomonas* reconnu de nombreuses fois comme agent de septicémie chez *B. mori* la déclenche effectivement mais le pourcentage de l'infection est relativement faible et la septicémie est toujours très tardive.

Le *Serratia marcescens*, germe assez rare comme agent spontané de septicémies chez *B. mori*, s'installe plus facilement sur la blessure que le *Pseudomonas*. En effet, le pourcentage de septicémie est supérieur avec *Serratia* et la durée d'incubation est plus courte.

Enfin, l'infection d'une plaie avec *Bacillus megatherium*, souche avirulente « per os » et par contact, donne des résultats inattendus. En effet, on assiste à un développement lent de la septicémie, atteignant un pourcentage de mortalité relativement élevé (12 p. 100).

Pour l'infection avec le virus de la polyèdrie, il n'est pas possible à l'heure actuelle de travailler avec des témoins exempts de la virose ainsi qu'en témoigne la figure nº 25. En effet, comme nous l'avons montré dans plusieurs travaux antérieurs (Vago, 1951 b, 1953 b) toutes les races de Vers à Soie actuellement utilisées présentent quelle que soit leur provenance, un certain pourcentage de virose même sans qu'aucune infection externe intervienne. L'importance de la polyèdrie spontanée dans un lot de larves dépend beaucoup des conditions climatiques et de l'alimen-

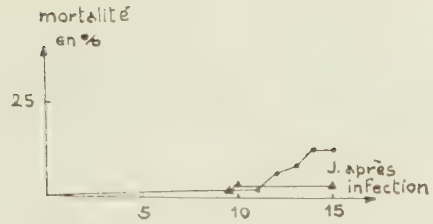
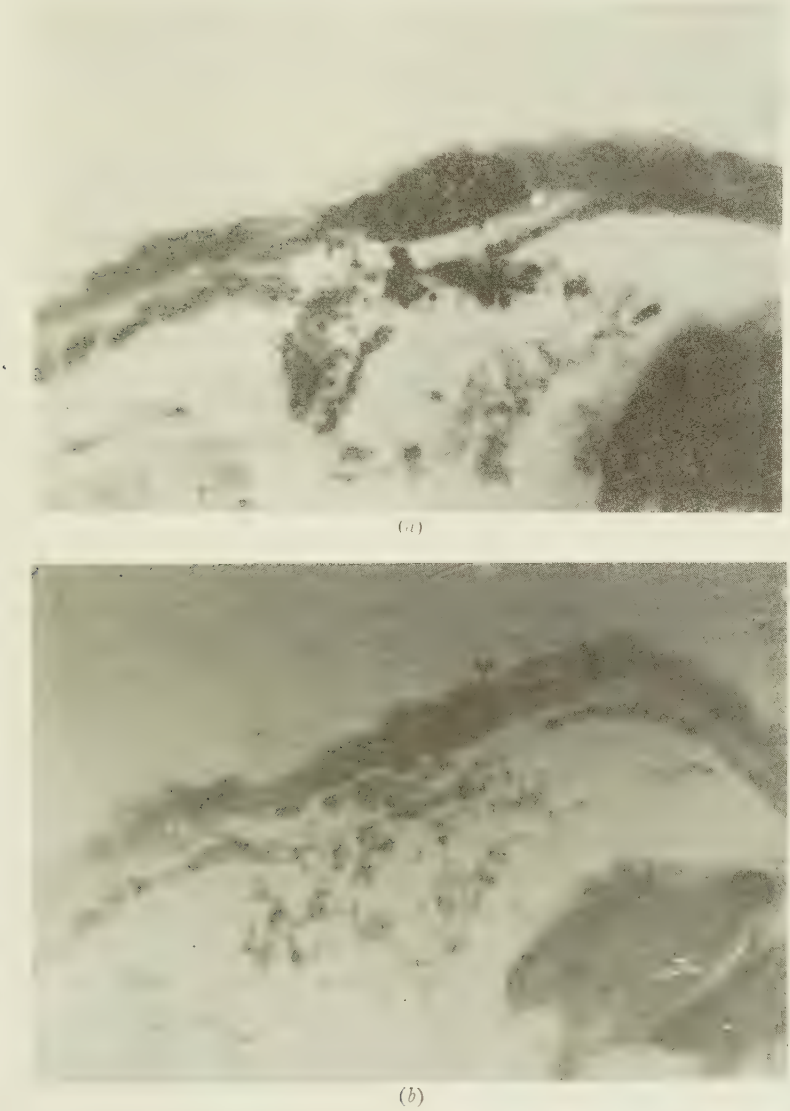


FIG. 26. — Analyse expérimentale des rapports entre blessures et infections virales. Mortalité des larves de *Bombyx mori* L. avec diagnostics pathologiques. ▲ infection sur épiderme intact. ● infection après blessure.



(*a*)

(*b*)

FIG. 27. — Décollement (*a*) et discontinuité (*b*) du tissu épidermique avec mélanisation de la chitine avec début de l'accumulation hémocytaire et avec pénétration de rares bactéries après coupure hémorragique chez les larves de *Ephestia kuhniella*.

tation. C'est pour celà que nous avons réalisé nos essais dans des conditions définies antérieurement (VAGO, 1951) et qui sont les moins favorables au déclenchement de la maladie. Les larves maintenues à 22°C ont été alimentées avec les feuilles de mûrier provenant de la partie centrale des pousses de l'année. L'élevage individuel a été réalisé dans une chambre climatisée fortement ventilée, dans des cases séparées, ouvertes de deux côtés.

Dans ces conditions, 1 p. 100 de mortalité dû à la polyèdrie et constaté dans le lot témoin, peut être considéré comme normal.

3 p. 100 de virose dans le lot blessé sans infection ainsi que 2 p. 100 dans le lot infecté sur épiderme intact, restent également dans les limites normales et n'impliquent pas forcément une cause extérieure.

Parmi les larves blessées et mises par la suite en contact avec la suspension de corps d'inclusion de virus, on relève une mortalité par virose nettement supérieure (12 p. 100). Cela dénote un effet favorisant de la blessure vis-à-vis de la pathogénèse des virus sans pouvoir toutefois considérer ces rapports comme particulièrement efficaces.

La totalité de ces essais a été également réalisée sur des larves de *B. mori* au 3e âge. Les résultats, bien que différents sur certains points (notamment en ce qui concerne la durée de l'incubation ou les degrés de sensibilité) sont comparables à ceux qui viennent d'être exposés.

* * *

L'ensemble de ces expériences effectuées sur larves de *B. mori* avec 12 souches microbiennes montre qu'une infection précédée par un traumatisme cutané, peut déclencher des processus pathologiques qualitativement et quantitativement différents de ceux découlant de traumatismes seuls ou d'infections seules.

Ainsi, une lésion cutanée préalable augmente l'action des cryptogames pathogènes capables d'agir même sur l'épiderme intact et elle rend possible la pénétration de germes pathogènes qui auraient été sans action dans le cas d'un épiderme intact. Elle augmente la probabilité d'infection chez les germes peu pathogènes pour un hôte et permet enfin à certains germes non pathogènes de réaliser un processus pathologique.

D'autre part, le contact des microorganismes avec une lésion cutanée n'empêche généralement ni la mélanisation, ni le début de la guérison de la lésion, mais peut transformer ce processus pathologique souvent bénin par lui-même en mycose généralisée, en mycose localisée avec conséquences secondaires, en septicémie bactérienne ou en virose se généralisant progressivement.

Toutes ces conséquences réciproques définissent des rapports entre deux éléments pathologiques ; à savoir : traumatismes cutanés et infections microbiennes. Elles mettent en évidence expérimentalement, un enchaînement de ces éléments dont les modalités seront définies par l'étude de la pathogénèse.

PATHOGÉNÈSE DU COMPLEXE

En vue d'étudier la succession des lésions liant les deux phases en un complexe, nous avons suivi l'évolution des symptômes macroscopiques et histopathologiques chez les Insectes blessés et infectés expérimentalement. Nous avons cru bon de résumer d'abord sur un exemple, la première phase, c'est-à-dire, le processus suivant le traumatisme jusqu'à l'aboutissement à la guérison.

Ensuite, la déviation du même processus a été suivie dans plusieurs types de complications par infections ultérieures.

Pour chaque essai, 100 Insectes environ ont été blessés selon les techniques précisées plus haut. Les lots destinés à l'étude du complexe entier, ont été infectés 30 minutes après le traumatisme par déposition sur la plaie de la suspension virulente.

A partir du moment de la blessure, nous avons réalisé une série d'observations macroscopiques, d'examens microscopiques à faible grossissement avec éclairage punctiforme sur la plaie et de recherches histopathologiques. Ceux-ci ont été effectués d'abord toutes les heures, ensuite toutes les 6 heures et les 24 heures jusqu'à la limite de 20 jours. Dans ces intervalles, les Insectes ont été fixés dans du liquide de Bouin et dans du formol salé à 6 p. 1 000. Parmi les techniques de coloration des coupes, nous avons retenu particulièrement celles permettant la différenciation dans l'épiderme et dans la cuticule chitineuse (MALLORY, hématoxyline de HEIDENHAIN, fuchsine acide — vert sulfo, hémalun-éosine-orange).

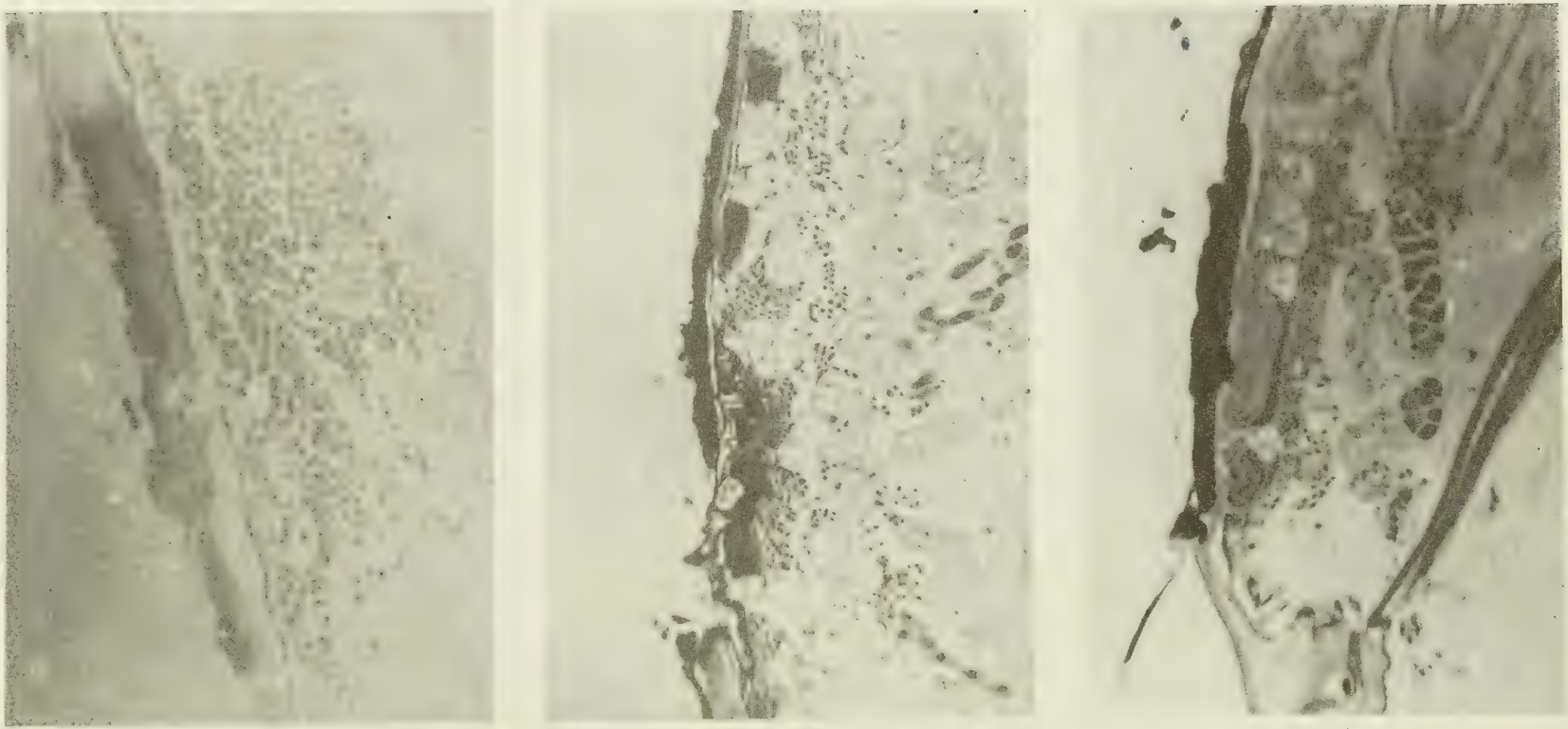
a) Traumatisme cutané et processus de guérison.

Les conséquences directes d'un traumatisme ont été suivies sur trois groupes d'Insectes (*Bombyx mori* et *Sesamia cretica, Lepidoptera, Melolontha melolontha, Coleoptera et Calliphora vomitoria, Diptera*) et avec deux types de traumatisme (coupure hémorragique et frottement cutané). Nous nous bornerons à la présentation d'un cas de chacun d'eux étudiés sur *Bombyx mori*, les autres n'ayant présenté que peu de différences.

Coupure hémorragique.

Les larves au 3^{e} stade sont blessées sur la partie dorsale du 3^{e} segment. La blessure traverse non seulement la cuticule chitineuse, mais également l'épiderme.

La blessure est inondée immédiatement d'hémolymphe restant en



(*a*) (*b*) (*c*)

FIG. 28. — Réactions successives déclenchées par une blessure hémorragique cutanée sur larves de *B. mori* L. *a*) Afflux des hémocytes dans la cavité générale vers l'épiderme lésé. *b*) Entassement des hémocytes contre les lésions cellulaires. *c*) Formation de pseudo tissu en contact avec l'épiderme et la chitine blessés.

surface sous forme d'une gouttelette ou continuant à suinter à travers la blessure pendant plus de 30 minutes, en mouillant la chitine environnante. Ces différences semblent être en rapport avec la position de la larve au moment de la blessure et au contact de la goutte d'hémolymphe avec un objet quelconque exerçant un effet aspirant provoqué par la tension superficielle.

Après une heure, les signes de mélanisation apparaissent et progressent rapidement. Au bout de 2 à 3 heures, une masse noire caillée, de consistance pâteuse mais solide recouvre la blessure débordant d'une façon irrégulière au-delà des limites de celle-ci.

A ce stade, les mouvements brusques des larves et notamment les réflexes de contraction consécutifs au toucher, font apparaître quelques gouttes d'hémolymphe à la limite de contact de la chitine saine et de l'hémolymphe mélanisée. La mélanisation de ces gouttelettes semble d'ailleurs être plus rapide que celle suivant immédiatement la blessure.

Histologiquement, la blessure très récente (1 h) se présente sous forme d'une rupture de la chitine et d'un déchirement net des cellules épidermiques : donc elle est uniquement caractérisée par des signes de traumatisme physique. A la surface externe de la chitine, une couche mince mélanisée entoure la lésion faisant contraste par sa couleur grisâtre avec la chitine saine. Dans la cavité générale on observe quelques amas d'hémocytes fusiformes à noyaux ronds, agglomérés en nombre plus important que de coutume. Cependant, il est difficile d'attribuer à ces éléments, une localisation ou une orientation.

Six heures après la blessure, stade auquel aucun nouveau changement extérieur n'est à noter, l'image histopathologique est profondément changée. Autour de la blessure, la mélanisation pénètre la cuticule en profondeur, avec transition progressive vers la chitine saine. La masse d'hémolymphe coagulée fortement mélanisée reste en dehors de la blessure collée contre la surface chitineuse.

Les cellules épidermiques détruites, sont détachées sur toute la longueur de la mélanisation. Sur cette même longueur, la cavité générale est remplie d'hémocytes (comp. Ito, 1953). Ceux-ci sans être entassés, s'accumulent nettement vers le centre de la blessure devenant de plus en plus rares à gauche et à droite le long de l'épiderme ainsi que vers la partie centrale de la cavité générale. On remarque très rarement des amas du même type cellulaire dans les parties de la cavité générale éloignées de la blessure. Ainsi, sur le côté opposé de la même coupe ils sont pratiquement absents. Sur les points d'accumulation dense, ces éléments touchent les cellules épidermiques lésées et semblent s'infiltrer entre elles. Leur affinité est d'une spécificité poussée vis-à-vis des cellules lésées ou peut être, comme le pense Wigglesworth (1937) vis-à-vis des protéines lysées. En effet, ni les cellules épidermiques, ni les cellules adipeuses ou du tissu musculaire ne semblent être en contact avec les

hémocytes. Ces derniers paraissent nager dans l'hémolymphe et ne se fixer que sur des tissus touchés par la blessure.

Il est intéressant de noter à ce sujet que sur l'épiderme situé sur les

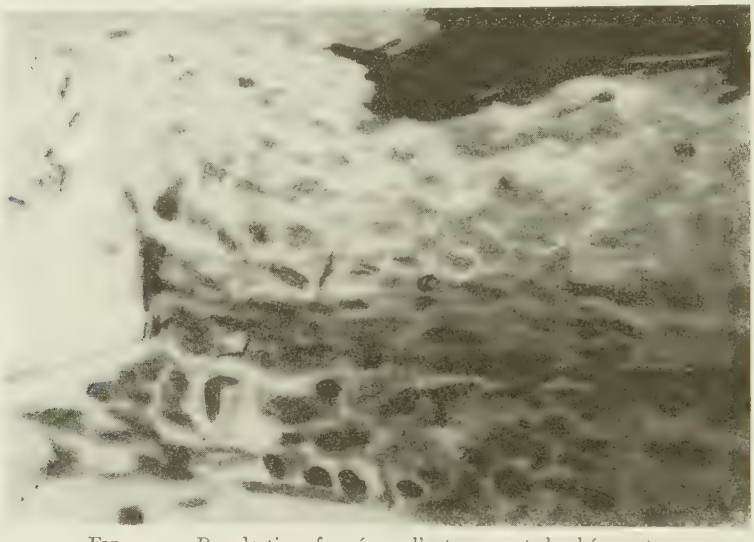


FIG. 29. — Pseudo-tissu formé par l'entassement des hémocytes contre la blessure (*Bombyx mori* L., larve). Hémalun-Erythrosine 1 : 800.

FIG. 30. — Afflux d'un groupe d'hémocytes contre une cellule épermique lésée légèrement par une blessure (*Bombyx mori* L., larve). Hemalun-Erythrosine 1 : 800.

deux côtés de la blessure, les hémocytes s'agglomèrent en amas autour de certaines cellules. Ils sont tout particulièrement entassés à la limite de la cuticule et des grosses cellules de l'épiderme. En partant de l'endroit de la blessure, signalons des agglomérats composés du nombre suivant

d'hémocytes : 17, 14, 12, 6, 6, 3, 3. Le nombre décroissant de ces éléments en fonction de l'éloignement de la blessure fait penser à un rapport avec cette dernière, et notamment à la possibilité d'infiltration le long de la couche épidermique de la substance attractive provenant des cellules détruites (fig. nº 30).

Au grossissement : 800 X, avec coloration à l'hémalun-érythrosine, nous obtenons des renseignements sur la morphologie des hémocytes en voie d'accumulation, autour des lésions. Ils sont uniformes et les modifications ne concernent que leur contour. Toutes les cellules accumulées ont leur cytoplasme fortement coloré en orange avec faible vacuolisation. Les noyaux toujours globuleux, ronds ou reniformes n'ont jamais de ramifications. La chromatine est répartie sous forme de granules de tailles variées, mais uniformément dispersées dans le noyau entier. Tout en conservant cette uniformité de coloration et de structure nucléaire, la forme des cellules varie. La plupart d'entre elles a un contour ovoïde avec quelques protubérances amiboïdes, d'autres sont allongées avec deux extrémités pointues, effilées presque en filaments. Entre ces deux formes extrêmes, nous trouvons tous les stades intermédiaires.

Chez les hémocytes en contact avec les cellules lésées, l'hétérogénéité de la forme s'accentue. Ici, les cellules en voie de superposition prennent la forme de l'emplacement disponible. Elles deviennent par exemple pointues en se plaçant entre deux cellules ou s'élargissant en se superposant sur d'autres cellules déjà en contact avec l'agglomérat.

Nous avons essayé d'établir une correspondance entre ces cellules douées d'une plasticité remarquable et les types d'hémocytes d'Insectes connus. D'après le classement de Paillot (1919), ces cellules pourraient être rangées aussi bien parmi les micro — que parmi les macronucléocytes. Cette comparaison ne donne pas de précisions complémentaires, cet auteur ayant classé la presque totalité des cellules sanguines dans ces deux catégories. Dans le système de Metalnikov (1922), les hémocytes en question pourraient être compris dans le grand groupe des « lymphocytes » bien que certaines formes montrent une ressemblance avec ce qu'il appelle les « leucocytes ». Nous pensons trouver plus de précisions en rapprochant ces cellules de certains types de « phagocytes » de Hollande (1909) mais elles sont cependant éloignées d'autres types de cellules que cet auteur appelle également « phagocytes ». Nous retrouvons des équivalents à beaucoup de points de vue dans le système de Yeager (1945) établi sur *Prodenia*. En effet, aussi bien la transition de formes entre ovoïdes et fusiformes que la structure nucléaire correspondent d'assez près aux « plasmocytes » de cet auteur. Les trois variantes extrêmes remarquées par celui-ci, sont également dans les limites de ce que nous avons décrit plus haut. Enfin, les « phagocytes » et les « proleucocytes » de Wigglesworth (1947) semblent appartenir à ce même groupe d'hémocytes.

L'exclusivité de ces types de cellules dans la réaction hémocytaire au cours de la première phase consécutive à une blessure, nous amène a attribuer aux « plasmocytes » un rôle spécifique, sans en exclure toutefois d'autres. Tenant compte des difficultés que présente l'établissement d'une équivalence entre les cellules-types définies par plusieurs auteurs dans l'hémolymphe des Insectes (Jones, 1950), nous considérons que ces hémocytes de trois types de transition doivent être particulièrement marqués par leurs fonctions immédiates vis-à-vis des traumatismes.

Douze heures après, la blessure présente des changements importants. Dans ses environs les hémocytes sont plus rares. Par contre, ils sont entassés en grand nombre près de la lésion. Contrairement au stade précédent, ils sont rarement à forme ovoïde ou fusiforme. La plupart se superposent étroitement et, serrés contre la chitine s'arrondissent ou s'aplatissent en formant des couches. A l'intérieur de ces dernières, il est presque impossible de délimiter les cellules particulières, seuls les noyaux sans changements morphologiques marquent leur emplacement. L'ensemble des cellules forme un agglomérat serré, une sorte de pseudo-tissu. Afin d'apprécier l'importance de cette accumulation, nous indiquons que l'épaisseur du « pseudo-tissu » dépasse celle de l'épithélium intestinal.

Au bout de 24 heures, les hémocytes libres deviennent peu nombreux et assez dispersés. Au niveau de la blessure en contact avec l'épiderme, ils sont entassés en une couche mince au point que l'on ne distingue plus de limites entre les éléments. Le contour des noyaux également en voie de dégénérescence, permet difficilement de reconstituer une structure.

A partir de ce moment, les images histologiques se ressemblent et accusent la dégénérescence progressive des hémocytes accumulés et la transformation du « pseudo-tissu » en une masse amorphe perdant toute structure cellulaire.

Dans la cavité générale, les rares hémocytes libres ayant les formes décrites plus haut, sont groupés en plus grand nombre autour de l'emplacement de la blessure, mais sans aucun rattachement précis.

Au fur et à mesure de la guérison, la masse des cellules accumulées depuis le début du processus avance vers l'extérieur. Parallèlement, la chitine perd sa mélanisation initiale sauf à la surface extérieure. La disparition de la chitine mélanisée est un signe de régénération de cette substance. Au bout de dix jours, une couleur nettement jaune, interposée dans la cuticule brunâtre permet de conclure à une formation nouvelle.

Les discontinuités de l'épiderme disparaissent, mais la structure de ce tissu n'est pas identique à celle de la partie saine où les cellules se succèdent avec des limites déterminées et des noyaux séparés. Sur les points en voie de guérison, trois à quatre couches d'hémocytes alternent avec de larges cellules épidermiques.

Un agglomérat de cellules amorphes, est collé autour de la masse mélanisée à l'extérieur de la cuticule. Cet ensemble en voie de dégénérescence, constitue une sorte de pellicule épaisse le long de la surface anciennement lésée.

Après 18 jours, l'état général de l'Insecte ne diffère aucunement de celui des Vers n'ayant subi aucun traumatisme. Extérieurement, la persistance d'une tache noire sèche, caractérise ce stade. Sous cet aspect extérieur stabilisé, l'histopathologie révèle une continuation active du processus suivi. En effet, sur les préparations fixées 10 jours après la blessure, les plasmocytes fusiformes et ovoïdes se limitent à quelques groupes d'une dizaine ou d'une vingtaine de cellules à proximité des lésions mais sans aucune orientation ou contact précis. Dans l'épiderme, l'épaisseur unicellulaire s'est rétablie sur presque toute la longueur de la blessure sauf sur quelques points où trois-quatre noyaux se superposent sans limites cellulaires précises. Une différence subsiste encore concernant la hauteur des cellules épidermiques. En effet, celles du nouvel épiderme sont environ trois fois plus hautes que celles de l'épiderme non lésé. Cette différence est progressive et se perd insensiblement. Elle dénote que les cellules de la nouvelle couche ne sont pas encore tout à fait identiques à celles de la couche originale malgré leur structure semblable, ce qui laisse supposer également des différences fonctionnelles. La chitine régénérée se présente sous forme jaune citron sans discontinuité.

La suite de la guérison est caractérisée par une variabilité selon les individus, relative au nombre des hémocytes agglomérés dans l'hémolymphe, à la superposition des couches nouvelles et anciennes de la chitine et à l'épaisseur de l'épithélium régénéré. Extérieurement la masse mélanisée persiste dans tous les cas. Dans quelques uns, les bords se brisent ou s'usent superficiellement.

Un ultime stade du processus est constitué par l'intervention d'une mue. Si cette dernière coïncide avec la période des premiers 10 jours suivant la blessure, des troubles de mue peuvent se produire d'ont l'importance est liée à celle de la blessure. La masse d'hémolymphe mélanisée adhère alors à l'ancienne cuticule ; le foyer de la blessure laisse des traces d'accumulation d'hémocytes et une discontinuité dans l'épiderme en voie de remplacement. Les changements tissulaires sont ainsi dérangés.

Si la blessure se trouve à un stade avancé de la guérison au moment de la mue, l'agglomérat mélanisé se détache entièrement avec l'exuvie et il est facile de retrouver sur cette peau non seulement les débris de cellules, mais également toute la chitine mélanisée en profondeur. Sur les larves venant de sortir de mue rien ne permet de reconnaître l'endroit précis de la blessure survenue au stade précédent de la vie larvaire. Les seuls signes pouvant être considérés comme la continuation du processus, résident dans l'accumulation de quelques hémocytes exactement à

l'endroit où la blessure était située. La couche cellulaire n'a pas une structure aussi régulière au point de vue succession longitudinale des cellules que dans un épiderme sain. Cependant, ces caractéristiques ne peuvent être remarquée qu'en connaissant à l'avance l'endroit précis de la blessure guérie.

Frottement cutané.

La partie dorsale du 3e segment des larves (3e stade) de *Bombyx mori* L. est très légèrement lésée avec du papier de verre (catégorie très fine « 00 ») sur une surface de 50 mm² environ.

Ce traumatisme a pour conséquence immédiate visible macrospociquement, une mélanisation de toute la surface lésée. Ce processus est en rapport avec le suintement d'une quantité à peine perceptible d'hémolymphe à travers la plaie ne semblant pourtant pas profonde. La sortie d'hémolymphe devient évidente à l'examen microscopique de la surface frottée car on y retrouve des macro et des micronuléocytes.

Histologiquement, avec coloration hémalun-erythrosine, la diminution de l'épaisseur de la couche chitineuse est nettement mise en évidence, ainsi que des taches mélanisées dispersées d'une façon discontinue à l'intérieur de la cuticule. Ces taches descendent en plusieurs points jusqu'à l'épiderme. Ce fait signale le contact de la blessure avec les cellules épidermiques bien que ces dernières ne soient pas directement lésées.

Six heures après le traumatisme, un grand nombre d'hémocytes apparaît dans la cavité générale et l'augmentation de leur densité définit nettement un afflux vers la surface lésée. Ces cellules paraissent être de même nature que celles observées lors de l'étude de la blessure profonde ; c'est-à-dire hémocytes ovoïdes ou fusiformes avec noyaux ronds. Elles montrent la même plasticité lors de contacts entre elles ou avec d'autres tissus.

Vingt-quatre heures plus tard, les hémocytes s'accumulent non seulement au-dessous de toute la surface ayant subi le frottement, mais encore ils s'entassent d'une façon très dense et forment un pseudo-tissu de structure semblable à celle du tissu se formant sur un point de blessure profonde. L'image histologique diffère essentiellement de celle de la coupure par les dimensions que peut acquérir un tel pseudo-tissu. En effet, la surface frottée étant étendue, les cellules accumulées couvrent déjà une longueur considérable et ceci sur une épaisseur pouvant atteindre à certains endroits 1/4 du diamètre du Ver entier. Il est probable que l'obstruction de quelques cellules lésées, est une tâche plus facile pour la réaction hémocytaire que celle visant à neutraliser des lésions même très réduites, mais répétées. Il est intéressant de remarquer que l'altération des cellules épidermiques ne semble pas être proportionnelle à cette réaction hémocytaire très forte.

Pendant les 4 à 5 jours suivant, l'entassement des hémocytes devient de plus en plus prononcé. Par endroit, la réaction semble diminuer ou être terminée. Par la suite, cet état se stabilise avec diminution des hémocytes dans l'hémolymphe. La cuticule se trouve d'ailleurs, et d'une façon irrégulière, en voie de régénération. On n'observe cependant pas un élargissement de la couche chitineuse usée jusqu'à l'épaisseur de la chitine saine. Ce n'est que l'intervention d'une mue qui peut supprimer presque entièrement les traces de ce processus pathologique comme nous l'avons indiqué pour les coupures.

*
* *

De ces exemples types sur *Bombyx mori* choisis en vue de suivre la première phase du complexe, deux séries de phénomènes peuvent être retenues pour les infections ultérieures.

D'abord, la discontinuité des cellules épidermiques, les lésions de ces mêmes cellules et la déchirure de la cuticule chitineuse ainsi que les perforations minimes mais nombreuses, constituent un milieu facilitant à priori une pénétration microbienne. Nous ajouterons aussi le contact créé par l'hémolymphe dépassant la chitine et se solidifiant entre la surface épicuticulaire et la cavité générale. Demême l'inertie considérable de la chitine perforée ne permet qu'une fermeture lente des lésions de cette couche.

D'autre part, des processus puissants semblent agir dans un sens opposé. La mélanisation et la solidification très rapide de l'hémolymphe au niveau de la chitine, l'adhésion de cette masse mélanisée à la chitine lésée, l'agglomération des hémocytes au niveau de la blessure et l'infiltration de ces cellules même dans les moindres interstices de l'épiderme, assurent à partir d'une demi-heure après la blessure jusqu'à guérison complète, une synergie d'action tendant à créer une étanchéité. Cette dernière progresse d'abord par l'entassement des hémocytes jusqu'à une structure presque tissulaire, ensuite par la véritable régénération de l'épiderme et de la cuticule. A ces phénomènes semble s'ajouter une réaction humorale dont l'étude n'est pas suffisamment avancée pour formuler des conclusions.

Pour voir dans quelle mesure ces processus synergétiques peuvent agir efficacement ou peuvent être contrariés par l'intervention ultéreure de l'infection microbienne, nous suivrons, sur plusieurs exemples, les cas à double phases.

Complications avec infections ultérieures.

Afin d'avoir un aperçu du mécanisme de ces complications dans notre cadre d' « essais types », nous avons choisi quatre cas d'enchaînement parmi ceux dont l'efficacité a été suivie au cours des recherches exposées

plus haut. Ces cas ont été définis de telle sorte qu'ils représentent des types caractéristiques et différents, soit au point de vue mode de traumatisme, soit au point de vue action microbienne. Ainsi, nous avons reproduit artificiellment sur *B. mori* L. :

a) le complexe d'une blessure cutanée hémorragique avec infection parasitaire à *Metarrhizium anisopliae* (Metch) Sor. ;

b) le complexe d'un frottement cutané avec infection saprophytaire à *Rhizopus niger* Ciag. Hew. ;

c) Le complexe d'une blessure cutanée hémorragique avec infection parasitaire à *Bacillus cereus* souche Anduze ;

d) le complexe d'une blessure cutanée hémorragique ou d'un frottement cutané avec infection virale à *Borrelina bombycis* Pail.

Les blessures effectuées selon les techniques décrites plus haut ont été suivies 30 minutes après l'apposition sur la plaie de suspensions virulentes.

Ces dernières ont été préparées pour les cryptogames à partir de cultures sur gélose Sabouraud non glucosée après la formation abondante de conidies ; pour l'infection bactérienne, à partir de cultures de 72 heures sur gélose nutritive pH 7-7,2. La concentration des suspensions a été d'environ 1 mm^3 de matière de culture pour 5 cm^3 d'eau stérile.

a) Complexe : blessure cutanée hémorragique avec infection parasitaire à *Metarrhizium anisopliae* (Metch.) Sor.

Les symptômes suivant immédiatement le traumatisme et l'infection, ne diffèrent en rien de ceux décrits lors de l'étude de la blessure seule. Macroscopiquement, mélanisation rapide de l'hémolymphe remplissant la fente de la cuticule ; microscopiquement, discontinuité du tissu épidermique sans autres changements cellulaires caractérisent cette période.

Lors de la solidification avancée de la masse d'hémolymphe mélanisée, l'image histologique de la sixième heure après l'intervention, montre un afflux d'hémocytes vers l'épiderme lésé comme ceci a été constaté avec la blessure seule. Le même processus se poursuit pendant les jours suivants : les hémocytes s'entassent de plus en plus contre l'épiderme lésé et ils forment un pseudo-tissu. dans lequel les limites cellulaires s'effacent de plus en plus. Aucun signe de dérangement pouvant être attribué à l'infection cryptogamique n'est à signaler.

Cet état se maintient par la suite, mais à l'histologie on obtient l'extension de la mélanisation de la cuticule au-delà des limites de la blessure, signe non constaté lors de la guérison d'une blessure cutanée sans infection. L'importance de cette observation se vérifie par la suite car à la loupe binoculaire et même à l'œil nu, on décèle des taches foncées autour de la mélanisation primaire à l'emplacement de la blessure. La surface de ces taches augmente visiblement d'un jour à l'autre. La couleur plus claire de la périphérie désigne en même temps la diffusion

progressive de cette réaction chimique. Conjointement, de larges filaments mycéliens sont visibles dans la cuticule. Ils sont situés parallèlement aux couches de la chitine et ils sont superposés dans une même direction. Sur plusieurs préparations nous avons décelé de très rares fragments mycéliens au-dessous de l'épiderme dans la cavité générale. A ce stade le développement cryptogamique a dépassé la cuticule. Précisons que sur aucune autre partie de la cuticule, de l'épiderme et de la cavité générale, nous n'avons pu déceler histologiquement les traces d'une action parasitaire.

L'avancement du processus consiste, d'après les observations effectuées à partir du 6e jour, en la présence de filaments mycéliens à l'intérieur du pseudo-tissu qui vient de se former par l'accumulation et l'entassement des hémocytes. Dans ce tissu, le mycélium semble suivre le sens de l'entassement et de l'aplatissement des hémocytes. Ce n'est qu'à quelques endroits que nous voyons apparaître un fragment orienté vers le centre de la cavité générale. Ceci d'ailleurs a lieu presque toujours aux endroits où les hémocytes accumulés ont une structure plus lâche. Dans la cavité générale, les éléments cryptogamiques sont rares. Il n'est pas possible de déceler non plus, de filaments de mycélia se dirigeant vers l'extérieur à travers l'épiderme et la cuticule comme ceci se produit lors de la formation des conidies. Nous nous trouvons ici dans la période typique précédant la généralisation d'une mycose.

Les taches mélanisées sur la cuticule continuent à s'étendre et au bout de 7 à 10 jours après l'infection, un point gris apparaît sur ces taches et prend un aspect cotonneux. Cet enduit est difficile à enlever même en grattant avec une spatule. Microscopiquement, il est constitué d'un mycélium cryptogamique sur lequel une flore bactérienne riche s'est installée. Cette flore comprend des coccis et des bâtonnets courts. Les souches isolées ont été déterminées comme appartenant aux *Staphylococcus albus* et aux entéro-bactéries. Aucune des souches d'ailleurs ne s'est révélée pathogène ni « per os » ni par injection dans la cavité générale, vis-à-vis des larves de *Bombyx*.

A partir de ce stade, tous les échantillons révèlent une évolution vers la généralisation de la mycose. Sur certaines préparations, on peut observer la sortie des filaments mycéliens de la cuticule à travers l'épiderme vers la cavité générale et sur d'autres, un phénomène semblable est à noter mais ayant son origine dans le pseudo-tissu situé au-dessous de la blessure. Les fragments mycéliens se retrouvent alors parsemés en diverses parties de la cavité générale. Un prélèvement d'hémolymphe immédiatement sous la blessure accuse également leur présence. Pour effectuer cette opération, on enlève la masse mélanisée couvrant toute la surface des lésions traumatiques. L'hémolymphe est absorbée par micro-pipette aussi bien sur la surface intérieure de la croute enlevée que dans l'orifice créé par cet enlèvement. A cet endroit, les mêmes

hémocytes que ceux déjà signalés se retrouvent dans le sang, mais en nombre plus important et avec prédominance des fusiformes. C'est l'aspect des fragments mycéliens qui change vis-à-vis de celui des parties éloignées de la blessure. Ici les filaments longs ne sont pas rares et même on observe couramment des ramifications multiples. Ceci correspond à l'aspect d'un mycélium en voie de développement continu ce qui dénote une phase plus stabilisée et plus avancée que celle où l'on rencontre des fragments à 2 ou 3 éléments et aux 2 extrémités pointues. De cette comparaison se dégage la priorité du développment au niveau de la blessure.

A partir de là, nous assistons au déroulement de la maladie généralisée. Les fragments mycéliens se dispersent dans toutes les parties du corps, se fixent sur les tissus adipeux, intestinaux et musculaires et donnent naissance aux filaments qui remplissent ensuite tout le corps, provoquent la mort avec consistance dure de l'insecte. Parallèlement, sur toute la surface cutanée, le mycélium apparaît après avoir traversé perpendiculairement la cuticule et il donne naissance aux conidies.

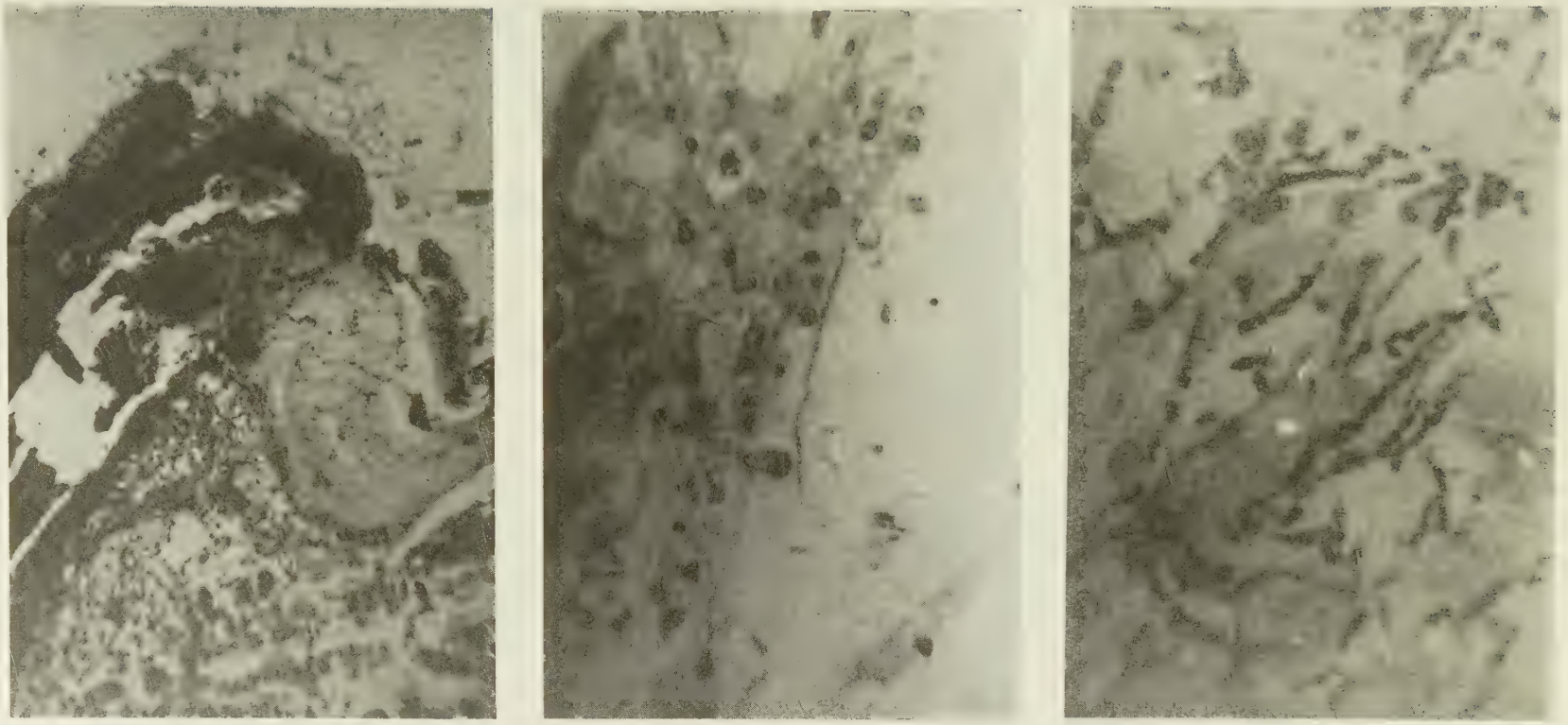
L'ensemble des observations concernant la pathogénèse de ce complexe montre que le cryptogame *M. anisopliae* s'installe avec facilité sur les lésions cutanées consécutives à une blessure. Il crée un foyer local se développant aussi bien dans la cuticule chitineuse que vers l'intérieur de la blessure. Les réactions hémocytaires consécutives à une blessure qui sont à première vue importantes ne présentent cependant pas d'obstacles majeurs à l'avancement des filaments mycéliens : ces derniers se dirigent entre les hémocytes accumulés. Au contact de l'hémolymphe, la mycose devient une affection généralisée et présente tous les symptômes de la maladie à *Metarrhizium*.

b) Complexe : frottement cutané — infection saprophytaire à *Rhizopus niger* Ciag. Hew.

Le début du processus pathologique est caractérisé par des symptômes ressemblant à ceux qui ont été observés à la suite dun frottement seul : dans les six premières heures suintement faible d'hémolymphe et mélanisation de toute la surface lésée, puis durcissement et dessiccation progressive de cette dernière.

Histologiquement, la mélanisation par taches et l'apparition des hémocytes dans l'hémolymphe avec accumulation aux abords de la surface blessée, sont les signes de début.

Par la suite, et pendant 4-5 jours, l'entassement des hémocytes et la formation d'un pseudo-tissu collé contre l'épiderme se réalisent progressivement et l'ensemble du processus prend le chemin de la guérison. Même des signes de faible régénération dans la cuticule sont apparents. Ce n'est qu'à la surface extérieure de la cuticule, au-dessus de la tache frottée, qu'on observe au bout d'une dizaine de jours l'apparition de



(*a*) (*b*) (*c*)

FIG. 31. — Infection secondaire par *Metarrhizium anisopliae* sur coupure cutanée (larves de *Melolontha melolontha*). *a*) Vue d'ensemble de la mycose localisée sur blessure et de la pénétration à travers la cuticule. *b*) Filaments mycéliens traversant le pseudo tissu des hémocytes. *c*) Pénétration du mycélium dans la cavité générale.

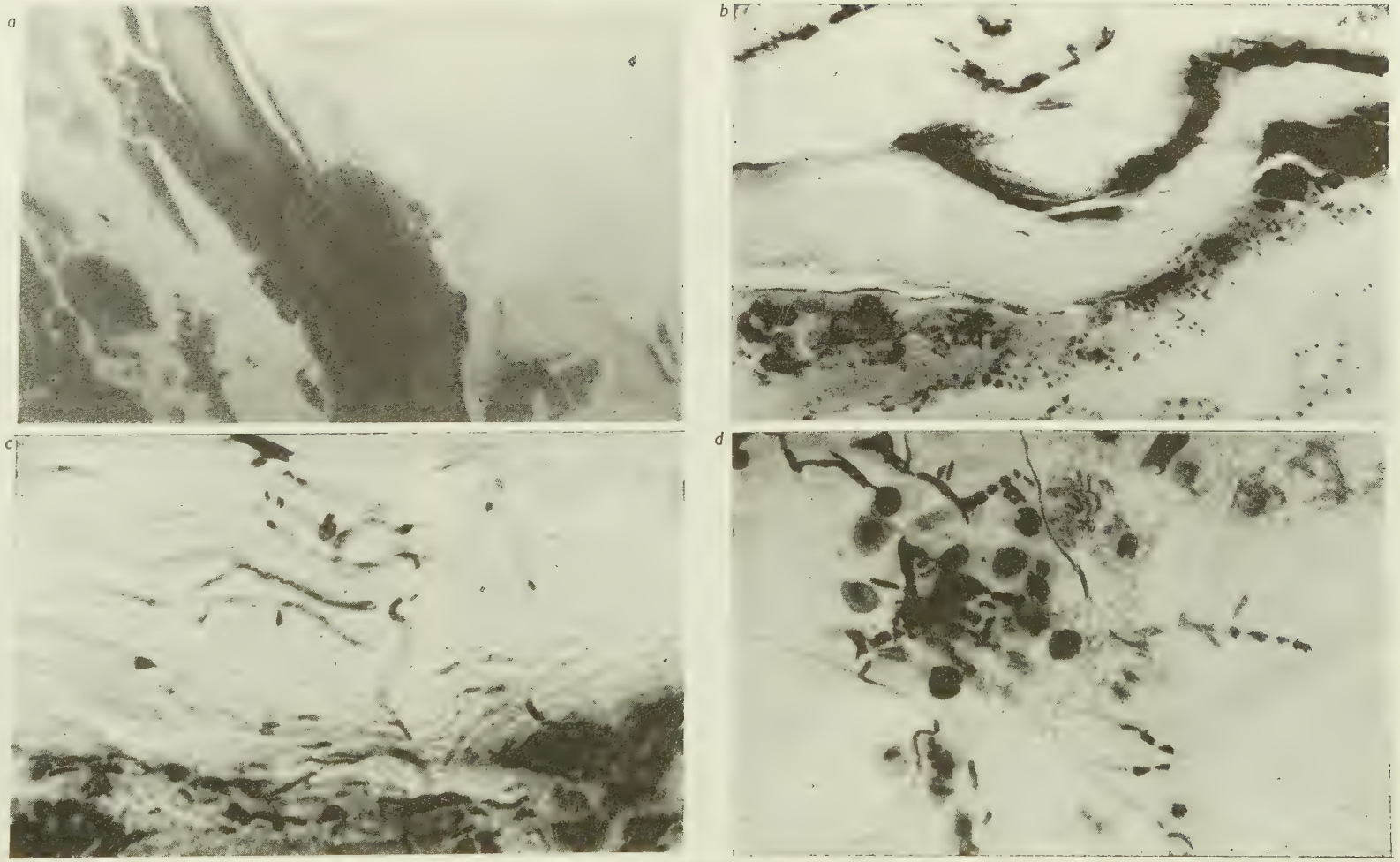


FIG. 32. — Blessure cutanée suivie d'infection secondaire à *Rhizopus nigr* sur larves de *Melolontha melolontha*. Hemalun — Erythrosine. *a*. Mycelium localisé sur blessure 1 : 800 *b*. Entassement d'hémocytes; progression du mycelium dans la cuticule 1 : 400. *c*. Hypha traversant la chitine et le pseudo tissu à hémocytes 1 : 800, *d*. Développement mycélien localisé autour du pseudo tissu. 1 . 800.

filaments mycéliens. Plus tard, une colonie abondante peut être remarquée au même endroit. Elle couvre, tout le long de la blessure, la surface cuticulaire, et on voit nettement le passage de quelques filaments de ce mycélium à l'intérieur de la chitine. Notons ici le contraste (sur les mêmes coupes histologiques) entre la rareté des éléments cryptogamiques dans la chitine et l'abondance du mycélium à la surface extérieure. Ce détail souligne la priorité du développement externe. A un stade plus avancé de la maladie (caractérisé macroscopiquement par l'apparition de taches de mycélium blanc visibles à la loupe et même à l'œil nu sur la surface mélanisée) on constate, histologiquement l'avancement des filaments mycéliens à l'intérieur du pseudo-tissu constitué par les hémocytes accumulés. Le mycélium envahit tout l'intérieur de cet amas de cellules et les filaments sortant et se dirigeant vers la cavité générale se fragmentent.

Soulignons la persistance de la nature localisée des fragments mycéliens dans l'hémolymphe et entre les tissus musculaires et adipeux situés au voisinage de la blessure. Les régions opposées de la coupe ne contiennent pratiquement aucun élément en voie de développement.

Nous attribuons ce phénomène au faible pouvoir pathogène de ce champignon et cette supposition est renforcée par la lenteur avec laquelle cette généralisation se réalise. De plus, le contact des hémocytes avec les filaments et fragments mycéliens arrivés dans l'hémolymphe (assez réduit chez un champignon fortement pathogène comme le *Metarrhizium*) est ici très fréquent. En effet, on voit rarement un fragment mycélien non entouré d'hémocytes mais nous n'avons pu déceler que peu de cellules en voie de phagocytose ou ayant intérieurement des fragments mycéliens intacts.

La touffe mycélienne devient de plus en plus importante à la surface de la blessure et la couvre entièrement au bout de 10 jours. L'Insecte s'atrophie et meurt en prenant une consistance pâteuse, sans être dur comme dans le cas des mycoses parasitaires. Il ne se recouvre que partiellement et sur des surfaces limitées (presque toujours autour de l'emplacement de la blessure)de mycélia à développement « post mortem » portant des conidies.

Le type de complexe que nous venons de suivre souligne tout particulièrement le rôle de la succession d'un traumatisme et d'une infection. Il nous fait assister aux étapes de prise de terrain par un cryptogame normalement incapable de provoquer une mycose et à l'extension de plus en plus parasitaire de ce même germe à la faveur de la défense réduite du terrain que constitue une blessure superficielle.

c) Complexe : blessure cutanée avec infection à *Bacillus cereus* cristallophore (souche Anduze).

Les lésions consécutives à la blessure infectée sont extrêmement

variées selon les cas et en ce qui concerne la rapidité de leur évolution. En effet, on observe quelquefois en même temps que l'accumulation des hémocytes autour des cellules lésées, l'apparition d'éléments bactériens dans l'hémolymphe. Ceux-ci se trouvent déjà en voie de multiplication car ils sont décelables non seulement sur frottis sanguins, mais également sur coupes. Dans d'autres cas au contraire, le processus de mélanisation de l'hémolymphe sur la cuticule ainsi que les réactions hémocytaires se déroulent normalement, et ce n'est qu'après la fermeture complète des lésions épidermiques qu'on retrouve des formes végétatives de la bactérie dans l'hémolymphe. Entre le moment de la blessure et celui de la multiplication de la bactérie dans l'hémolymphe, il est difficile de définir histologiquement les stades intermédiaires de la pathogénèse. Nous devons cependant considérer le fait que si la bactérie se multiplie dans l'hémolymphe et au contact du tissu adipeux, en même temps ou après le groupement de masse des hémocytes au niveau de l'épiderme, le germe a dû dépasser ce pseudo-tissu à un moment antérieur à sa formation, ou bien progresser en se multipliant dans celui-ci. D'après les examens de prises de sang simultanées dans la plaie et d'autres points de la cavité générale, la pathogénèse consiste en la multiplication des bactéries dans la plaie pendant et après la coagulation de l'hémolymphe. Il ne semble pas qu'il y ait une différence particulière au point de vue facilité de multiplication entre les cellules épidermiques lésées, les organes et l'hémolymphe de la cavité générale. On assiste alors au développement d'une septicémie généralisée.

d) Complexe : blessure cutanée hémorragique ou frottement cutané avec infection virale à *Borrelina bombycis* Pail.

En dehors des corps d'inclusion polyèdriques qu'on retrouve après l'infection dans la masse d'hémolymphe coagulée, aucun processus n'est visible à l'histologie. L'action des hémocytes et les autres processus de guérison se déroulent sans aucun changement. Ce n'est qu'au bout de 5 à 6 jours, quand les conséquences directes de la première phase du complexe sont en voie de disparition, que les noyaux des cellules sanguines, du tissu adipeux et des cellules épidermiques, commencent à s'hypertrophier et que la chromatine s'agglomère en taches. Ces altérations sont suivies progressivement par l'apparition de corps d'inclusion intra-nucléaires dont le nombre augmente dans tous les tissus. Aux divers endroits du corps ces altérations apparaissent à peu près au même moment ce qui dénote une généralisation de l'agent infectieux transporté par l'hémolymphe. Cependant, sur certains exemplaires nous avons noté en examinant les tissus de plusieurs larves, les troisième, quatrième et cinquième jours après l'infection, que les premières déformations de la chromatine sont d'abord visibles dans les cellules épithéliales alors que normalement les cellules sanguines paraissent plus rapidement atteintes. Nous consi-

dérons que la blessure favorise une infection virale par suite de l'infiltration mécanique des polyèdres restés fixés dans la masse d'hémolymphe coagulée. Soulignons l'importance de cette voie d'infection, car normalement la pénétration des virus ne se fait pas par la voie cuticulaire. Ainsi, la blessure représente, par le mécanisme que nous venons de décrire un moyen inhabituel mais efficace d'infection virale.

INFLUENCE DE LA GUERISON SUR L'EFFICACITE DE L'INFECTION SECONDAIRE

L'étude expérimentale que nous venons de relater a dû être effectuée dans certaines conditions standard avec des blessures-infections-types afin de pouvoir dégager les principes d'action sur des exemples compatibles avec le cadre de ce travail. Des travaux ultérieurs montreront certainement qu'en variant les facteurs, la pathogénèse subit des modifications. Cette remarque est également valable en ce qui concerne le décalage séparant la deuxième phase du complexe de la première c'est-à-dire l'infection du traumatisme. En effet, dans toutes nos expériences l'infection a été effectué 30 minutes après la blessure afin de nous placer dans des conditions comparables et notamment dans celles d'un traumatisme récent.

Nos travaux préliminaires ont attiré constamment notre attention sur la variation que peut occasionner dans l'établissement d'un complexe le moment de l'infection par rapport à la blessure. Nous n'avons pas méconnu ce facteur et c'est pour cela que nous avons tenu à apporter des précisions à ce sujet dans le cadre de quelques essais types.

Ainsi, les larves de *Bombyx mori* (3^{e} âge) ont été infectées 6 heures, 24 heures, 48 heures et 4 jours après une blessure cutanée hémorragique ; les microorganismes portés sur la plaie étaient les suivants : *Metarrhizium anisopliae* (Metch.) Sor., *Beauvaria bassiana* (Bals.), *Rhizopus niger* Ciag Hew, *Bacterium paracoli* Gilb. et Lion., *Bacillus cereus alesti* Toum. Vago, *Borrelina bombycis* Pail. Le mode et les conditions d'infection étaient ceux précisés pour l'ensemble des études expérimentales.

Les infections suivant immédiatement le moment de la blessure se réalisent le mieux. Cette remarque n'est pas absolue et est en réalisation avec les espèces microbiennes. Dans le cas de bactéries sporogènes douées d'effets toxiques aussi bien que dans celui de bactéries dépourvues de spores, la progression de la fermeture de la blessure par la mélanisation et la dessication de l'hémolymphe au niveau de la cuticule diminue rapidement les chances de prise.

De telles conclusions sont également valables pour le virus de la polyèdrie partant de matière infectieuse constituée de corps d'inclusion.

Pour les cryptogames entomophages tels que *Metarrhizium* et *Beauveria*, la diminution de la facilité donnée par la blessure est bien moins prononcée. En effet, même les infections survenues après la mélanisation de la blessure, provoquent un taux de mycose supérieur à celui obtenu sur cuticule non lésée. Par la suite, une fois desséchée et durcie, l'hémoplymphe mélanisée ne favorise que légèrement le déclenchement d'une infection.

Les champignons moins pathogènes comme le *Rhizopus*, semblent pouvoir trouver des facilités de prise sur l'hémolymphe coagulée même à un stade avancé de la guérison.

Les facteurs qui interviennent dans les phénomènes observés semblent être liés avant tout à la nature plus ou moins mécanique de la facilité d'infection par la blessure.

Les bactéries et les corps d'inclusion de virus ayant un pouvoir pénétrant peu actif, sont retenus par la constitution physique d'une blessure en voie de guérison. Les cryptogames, grâce au mode d'action mycélienne sont moins liés à ces facteurs. Pour leur prise sur la blessure, l'état légèrement humide de celle-ci par rapport à la chitine semble être également un facteur favorisant, non seulement en facilitant l'adhésion, mais encore le départ d'un myélium localisé. Enfin, les conditions en partie saprophytaires de la masse d'hémolymphe coagulée à la surface de la plaie et perdant de plus en plus le contact avec l'organisme vivant, offrent un terrain pour des cryptogames facultativement parasites en permettant la création d'une colonie locale. Cette propriété de la surface de la plaie est confirmée également par le développement régulier sur ce même point, de bactéries saprophytes dépourvues de tout pouvoir pathogène vis-à-vis des Insectes.

CONCLUSIONS

Sur divers Coléoptères et Lépidoptères atteints dans la nature, et d'une façon spontanée, d'affections cryptogamiques,bactériennes, ou virales, des signes anatomiques et histologiques de traumatismes simultanés ont été reconnus. Dans d'autres cas, des lésions dues à des blessures en voie de guérison portent en leurs points centraux des mycoses localisées.

D'après les recherches expérimentales sur les rapports entre traumatismes et infections ultérieures effectuées sur larves de *Bombyx mori* un contact microbien survenu après une blessure peut modifier cette affection souvent bégnine en elle-même, dans le sens d'une :

— mycose généralisée,

— mycose localisée à évolution chronique secondaire mortelle,

— septicémie bactérienne avec généralisation rapide ou lente,

— virose s'étendant progressivement sur l'ensemble des tissus sensibles.

D'un autre côté, le fait qu'une lésion préexiste au moment d'un contact cutané avec des germes a une influence sur l'action de ces derniers. Une lésion préalable :

— augmente les cas de mycose dus à des cryptogames pathogènes même sur épiderme intact,

— permet une infection cryptogamique dans le cas d'une hygrométrie normalement insuffisante,

— rend possible l'évolution de la pathogénèse de certains germes incapables de réaliser une infection sur épiderme intact,

— augmente la possibilité d'infection avec des germes peu pathogènes pour un hôte donné,

— permet à certains germes, considérés comme non pathogènes, de réaliser un processus pathologique.

De l'ensemble de ces modifications survenues dans deux catégories d'affections pathologiques, se dégage, lorsque celles-ci se trouvent superposées, l'existence de rapports d'enchainement rapprochant les deux actions en un complexe.

La nature de ces liens est étroitement liée au processus histopathologique de la guérison du traumatisme.

Retenons les réactions immédiates de mélanisation de l'hémolymphe, l'afflux d'hémocytes vers l'épiderme lésé avec formation d'un pseudo-tissu, la solidification de la masse coagulée, la régénération progressive de la chitine et de l'épiderme et l'influence déterminante des mues.

La discontinuité de l'épiderme et la déchirure ou les perforations minimes de la cuticule semblent faciliter une pénétration microbienne. L'hémolymphe solidifiée dans la plaie crée une voie directe vers la cavité générale. D'autres processus agissent dans le sens opposé. La mélanisation et l'adhésion de l'hémolymphe au niveau de la chitine ainsi qu'un afflux des hémocytes tendent à l'établissement d'une étanchéité. La formation d'un pseudo-tissu serré et la régénération des tissus accentuent cette tendance.

La complication de la blessure primaire par une infection secondaire, précise la valeur de ces processus vis-à-vis de la pénétration des germes.

Bien que l'infection d'une blessure hémorragique avec le cryptogame très pathogène *Metarrhizium anisopliae* ne change en rien le processus de guérison elle augmente la surface mélanisée ; l'hémolymphe coagulée ainsi que le pseudo-tissu hémocytaire sont rapidement traversés par les filaments mycéliens. Ces derniers créent dans l'hémolymphe une mycose généralisée. Les processus de guérison ne peuvent ainsi nullement s'opposer à la pénétration et les lésions facilitent cette dernière.

C'est par la création d'une colonie localisée sur l'hémolymphe mélanisée que le champignon peu pathogène *Rhizopus niger*, agit sans toutefois déranger la guérison. Le mycélium traverse très lentement la masse mélanisée et le pseudo-tissu mais ce n'est qu'après atrophie avancée que le champgnon envahit l'organisme peu résistant. La plaie en voie de guérison semble offrir un terrain de moindre résistance à partir duquel une action pathogène progressive est facilitée.

Le mécanisme de la fixation de certaines bactéries speticémiques (*B. paracoli*) sur la blessure est encore différent. Une infiltration au cours de la multiplication du germe dans l'hémolymphe coagulée et dans le pseudo-tissu ainsi qu'un entraînement mécanique précèdent la septicémie. La discontinuité de l'infiltration rend ce processus moins efficace que celui des cryptogames avec hypha exerçant une pression. Cependant la pathogénèse est favorisée par rapport à une infection sur cuticule intacte où la bactérie est incapable d'amorcer une septicémie.

Enfin, le contact des blessures avec les corps d'inclusion de virus (*Borrelina bombycis*) semble amener l'infection par infiltration mécanique à travers l'hémolymphe qui remplit la plaie ou à partir des polyèdres fixés dans la masse d'hémolymphe en voie de coagulation.

Un facteur décisif pour la réalisation du complexe réside dans le moment de l'infection au cours de la guérison de la blessure. Alors que pour le virus et les bactéries étudiées, la possibilité d'infection diminue rapidement à partir du moment de la blessure, pour les cryptogames pathogènes celle-ci n'arrive que progressivement au taux normal de pénétration par la cuticule. Enfin, pour les cryptogames peu pathogènes, elle se maintient jusqu'à la guérison.

L'établissement de l'enchaînement varie en fonction des souches de la même espèce microbienne, surtout en ce qui concerne les souches facultativement pathogènes.

D'après les examens, les études histologiques et les cultures effectuées sur de nombreux insectes malades provenant de la nature ou d'élevages et présentant des anomalies cutanées, les complexes entre blessure et infections ultérieures paraissent être fréquents dans la nature. Ils ont été retrouvés sur les Lépidoptères, les Coléoptères, les Orthoptères et les Diptères. Les larves souterraines en présentent des proportions particulièrement élevées.

Notons également qu'après le passage des instruments de labour dans le sol, à côté des larves tuées mécaniquement, il a souvent été possible de trouver de nombreuses affections localisées sur blessure avec généralisation ultérieure ce qui constitue un aspect particulier de cet enchainement.

Chapitre VI

COMPLEXE AFFECTIONS SUBAIGUES — ÉTAT « VER COURT »

ORIGINE DE LA MISE EN ÉVIDENCE DU COMPLEXE. PROBLÈME DES VERS COURTS ET ESSAIS DE DÉFINITION DE CET ÉTAT PATHOLOGIQUE

Un type d'enchaînement d'affections pathologiques s'est dégagé au cours des études sur l'étiologie d'une maladie intéressant la sériciculture. Cette maladie consiste en un état anormal des larves de *Bombyx mori* L. au moment de la « montée ». Elle est désignée sous les noms de « vers courts » ou « courches » (français), « riccioni » ou « fratti » (italien). Cette affection ancienne et courante dans les élevages, n'a pas été l'objet d'études comparables à celles relatives aux quatres maladies classiques du Ver à Soie : la flacherie, la grasserie, la pébrine et la muscardine.

Pour la caractériser nous ne pouvons mieux faire que de résumer les nombreuses et identiques descriptions morphologiques existant dans les ouvrages sériciculeurs anciens (Anonyme, 1760 ; Boissier de Sauvages, 1788 ; Nysten, 1808, Leclerc, 1850 ; L'Arbousset, 1893). Sont appelés « vert courts » les larves qui au moment de la montée, pendant que les autres filent leur cocon, se déplacent soit dans la bruyère, soit sur la litière ou bien restent immobiles sans manifester l'intention de « monter ». Elles ne font pas de cocons et dispersent leur soie au hasard et même souvent n'en émettent que peu ou pas du tout. Elles se raccourcissent progressivement, meurent ou parfois se transforment en chrysalides.

Les « verts courts » sont connus par tous les sériciculteurs et rares sont les élevages où ils n'apparaissent pas. A l'échelle française ils causent couramment des pertes de 0,5 à 3 p. 100 mais une mortalité de l'ordre de 5 à 8 p. 100 est assez fréquente. Dans certains cas, celle-ci peut être de l'ordre de 50 à 80 p. 100. L'importance de cette affection au point de vue sériciculeur doit donc être évaluée d'une part, comme cause de pertes réduites mais courantes, d'autre part, comme accident atteignant la majeure partie d'un élevage.

La nature imprévisible de la maladie, ainsi que ses incidences économiques ont suscité plusieurs tentatives en vue d'expliquer sa nature et de mettre au point une prophylaxie.

Ainsi, à peu près à la même époque, les « vers courts » ont été attribués à l'effet du froid ou à la chaleur excessive (L'Arbousset, 1893 ; Tomei, 1924). L'humidité élevée (Dandolo, 1861) et la charge électrique

de l'atmosphère au moment des orages ont également été mises en cause ainsi que les techniques d'élevage (Roux, Gravillon 1857) et même la disposition et le moment de pose (Bonafous, 1840) de la bruyère sur l'encabanage. Des facteurs intrinsèques comme les cas tératologiques de la filière et l'atrophie ou la malformation des glandes séricigènes ont été considérés comme effets étiologiques.

Des bacologues proches de nous ont noté cette grande variété d'opinions, Acqua (1930) rapproche cette maladie des flacheries tout en avouant son ignorance au sujet de la cause. Buonocore (1937) précise pour certains cas le rôle des anomalies de la glande séricigène.

Aujourd'hui, les opinions des sériciculteurs sont non moins divergentes. Les accusations visant le froid et la chaleur, les anomalies raciales ou l'encabanage se retrouvent, mais les producteurs soulignent les contradictions qui se produisent dans l'apparition des « verts courts », d'une année à l'autre.

De l'étude bibliographique et de la consultation des sériciculteurs se dégage l'absence d'une opinion fondée sur des expériences suivies et acceptée par la majorité, d'où la nécessité de reprendre le problème pour définir expérimentalement l'état « ver court ».

La première partie de nos travaux a eu pour but de reconnaître les caractéristiques morphologiques basées sur la constance des dimensions en fonction du stade d'évolution des « vers courts ». D'abord des mensurations « pour voir » ont été effectuées comparativement aux vers sains, dans plusieurs élevages appartenant à des races industrielles : Roustan Gros Var, Roustan Chinois Doré, Bagdad et Agniel Jaune. Ces sondages nous ont semblé utiles du fait que les races sont caractérisées par des différences de taille des larves et qu'aussi la constance des rapports entre dimensions des vers était susceptible de ressortir plus clairement.

Les longueurs maxima et minima correspondant à l'allongement et à la contraction du même ver, ainsi que les largeurs des deuxième et cinquième segments, varient peu dans une même catégorie et une même race. L'ensemble des valeurs croît proportionnellement aux dimensions du ver normal de la même race.

Le « ver court » en évolution diffère beaucoup d'un ver normal au moment de la « montée ». Les différences morphologiques peuvent être exprimées par des rapports chiffrés. Elles consistent essentiellement en une diminution de la longueur maxima des vers et une diminution moins importante de la longueur minima avec réduction insignifiante de la largeur des segments. En dehors de ces caractéristiques, une différence essentielle peut être exprimée par le rapport : longueur maxima/longueur minima, celui-ci étant beaucoup plus important chez la larve normale que chez le « ver court » (fig. n° 33).

Il est ainsi possible, grâce à ces mensurations, de caractériser les

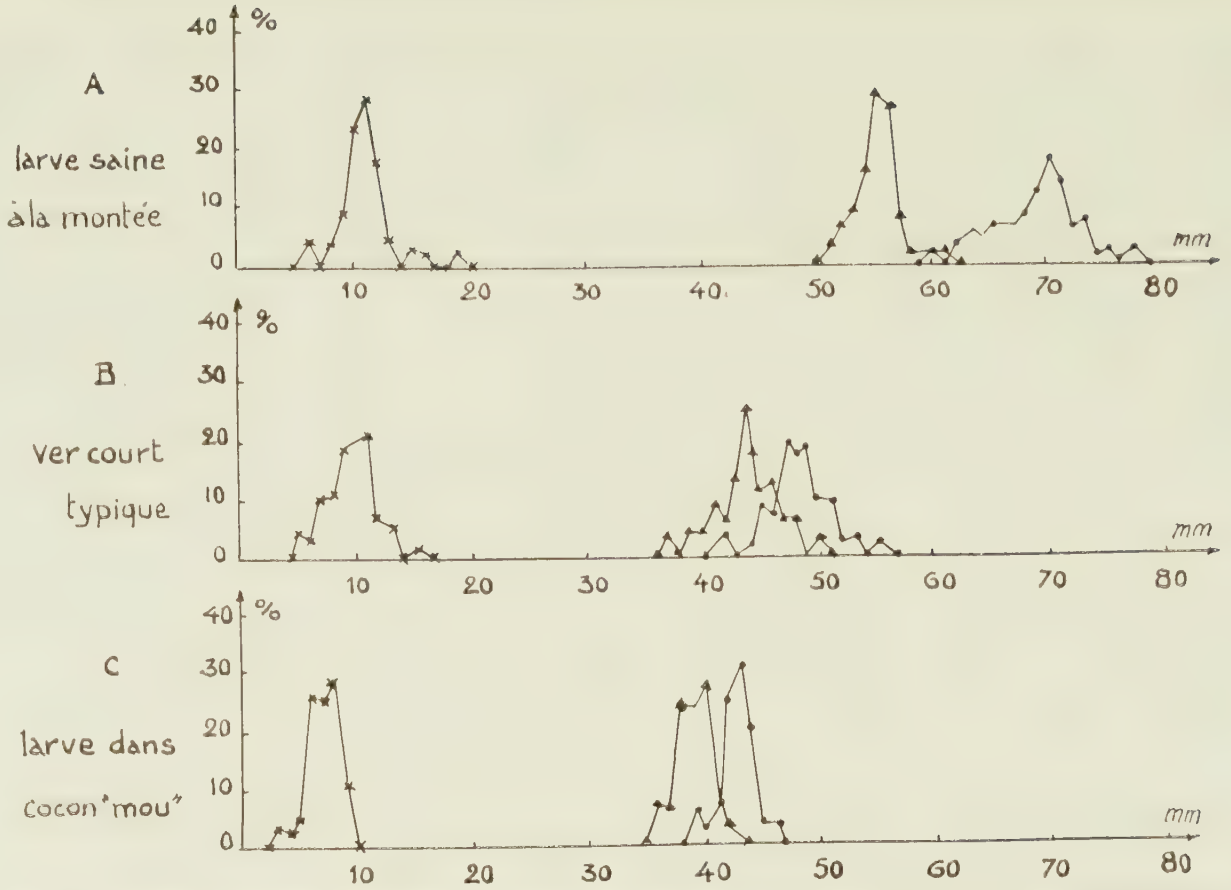


FIG. 33. — Courbes de fréquence comparatives des dimensions chez les formes prénymphales de *B. mori*. ● longueur en état d'allongement. — ▲ longueur en état de contraction. — × largeur du 5e segment (état d'allongement).

« vers courts » typiques d'une race donnée, à condition d'avoir à sa disposition des vers sains témoins du même élevage au moment de la « montée ». Cette méthode a été utilisée pour tous nos essais ultérieurs.

La caractérisation des « vers courts » a tiré parti également de certains signes physiologiques.

Tout d'abord l'état de l'intestin a été examiné par dissections effectuées sur environ 300 « vers courts » appartenant aux races : Roustan Gros Var, Roustan Chinois Doré, Bagdad et Agniel. La majorité des « vers courts » a le tube digestif vide d'aliment. Lorsqu'existent des débris de feuilles, ils se trouvent dans l'intestin moyen et l'intestin postérieur. Donc une tendance à l'évacuation sans ingestion de remplacement se dessine. Les excrétions sont jaune clair ou rougeâtres comme au moment de la préparation à la mue nymphale et la sécrétion intestinale, comme pendant la prénymphose, est abondante.

Les mouvements sont également caractéristiques. En effet, si l'on en juge d'après les différences considérables des moyennes de vitesse de déplacement, les mouvements sont déjà réduits au début de l'état « ver court » (9 cm/min.) par rapport à ceux d'un ver normal à la période de la « montée » (80 cm/min.). A un stade plus avancé, les « vers courts » sont presque paralysés, incapables de se déplacer et leurs mouvements se limitent au tremblement des vraies pattes.

Un autre symptôme est la réponse des vers au toucher. Alors que les vers normaux relèvent la tête et les segments terminaux, les vers courts réagissement par des mouvements alternatifs de la partie abdominale, c'est-à-dire comme des nymphes.

Enfin, ont été recherchées sur 180 larves, en vue de la caractérisation, d'éventuelles lésions pathologiques. La consistance de l'hémolymphe ne présente pas de différences sensibles vis-à-vis de celle des vers sains, pas plus d'ailleurs que les réactions tinctoriales des cellules sanguines. Les glandes séricigènes sont normalement développées et leur partie conductrice, la plus proche de la filière, contient une substance analogue à la fibroïne, mais montrant avec la coloration fuschsine acide — vert sulfo, une nuance plus verdâtre. Le tube digestif n'a aucune particularité histologique en dehors de l'absence ou de la rareté des feuilles dans la partie antérieure du méso-intestin. Dans la partie postérieure du méso-intestin, les diverses phases de sécrétion sont comparables à celles constatées chez les Vers à soie sains à la fin du 5^{e} âge.

D'autres lésions apparaissent facultativement. Ainsi on constate chez les hémocytes une pycnose et une vacuolisation du cytoplasme. Dans d'autres cas, les tissus adipeux, péri-trachéaux et épidermiques contiennent des cellules hypertrophiées. Les noyaux très gros peuvent renfermer des corps polyèdriques réfringents, réfractaires aux colorants anilines. Enfin, chez d'autres larves, nous avons rencontré des sporo-

zoaires dans les cellules épithéliales et sanguines et surtout dans les glandes séricigènes.

De la comparaison de ces caractéristiques se dégagent deux catégories de signes histopathologiques. En effet, ceux qui sont énumérés les premiers définissent un état particulier sans lésions pathologiques. L'état « ver court » apparaît ainsi comme une forme anormale du stade pré-nymphal, et constitue un syndrome pathologique bien défini. La déviation pathologique provient de l'anomalie d'une fonction physiologique obligatoirement liée à la période de confection du cocon.

Cette définition transpose immédiatement le problème pathologique sur un autre plan : la recherche des causes amenant cet état anormal. Ainsi, l'état « ver court » devient une affection secondaire impliquant l'étude du processus la précédent.

Pour une telle étude, nous avons tenu compte de la deuxième catégorie des caractéristiques symptomatologiques et histopathologiques. La vacuolisation des hémocytes et la pycnose de leur noyau remarquées dans certains cas, signalent une intoxication ou une auto-intoxication. L'hypertrophie nucléaire avec formations cristalloïdes est une caractéristique des viroses à *Borrelina*. Enfin, la présence de spores de sporozoaires dans divers tissus, et notamment dans les glandes séricigènes, correspond à l'image histologique de la pébrine. Il faut aujouter à ces signes histopathologiques, des observations d'ordre climatologique ou physiologique relatives à l'apparition des « vers courts » par suite de chocs de température et d'humidité, d'anomalies d'alimentation, de cas tératologiques ou de conditions de la « montée ».

L'ensemble de ces observations laisse prévoir l'importance de nombreux facteurs prédisposant le ver à l'état « ver court ». Nous présentons les observations de cas spontanés dans lesquels un état pathologique primaire semble être en rapport avec l'évolution secondaire en « vers courts » au moment de la montée.

OBSERVATIONS RELATIVES A L'INFLUENCE D'AFFECTIONS PATHOLOGIQUES SUR LA FORMATION DES « VERS COURTS »

Certains bacologues (Combe, 1844 ; Bonafous, 1840 ; Gourdon, 1852 ; Anonyme, 1760) ont remarqué la fréquence des « vers courts » dans les éducations atteintes des maladies habituelles du Ver à soie. Acqua (1930) parle des « vers courts » dans un chapitre relatif à la « Flacherie » tout en concluant qu'ils peuvent être difficilement rangés dans le cadre de cette maladie. Buonocore (1937), dans son étude sur les anomalies de l'émission de la soie, note également une proportion inhabituelle de « vers courts » dans les élevages pébrinés.

Nous avons recherché systématiquement les cas de « vers courts » liés à d'autres affections et pour cela nous avons organisé dans les trois principaux départements séricicoles un système d'alerte nous permettant de suivre ces cas de près grâce aux moyens de déplacement mis à notre disposition par la Station Séricicole d'Alès et la position centrale d'Alès vis-à-vis des zones séricicoles.

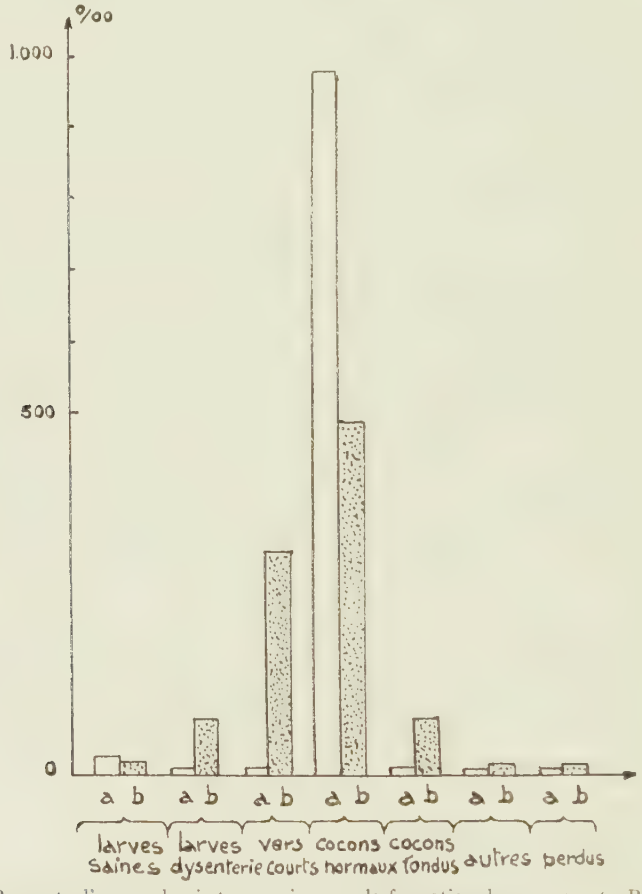


Fig. 34. — Rapports d'une asphyxie temporaire avec la formation des vers courts. Bilan du 8e jour de la montée. — a : sans traitement. — b : après 12 heures de séjour dans 100 cm³ d'air/1 ver le 8e jour du cinquième âge.

Pendant 5 années, de 1949 à 1954, nous avons pu ainsi établir un fichier des examens sur place concernant les cas spontanés. Celui-ci a été basé sur les examens microscopiques effectués immédiatement et sur la définition des micro-climats par l'emploi d'instruments enregistreurs.

Asphyxie temporaire. Flacherie. « Vers courts ».

L'existence d'un rapport entre l'effet de la « touffe » (augmentation de température jusqu'à 32-35°C., humidité relative au-dessus de 90 p. 100

et immobilité de l'air au niveau des larves) et l'apparition des « vers courts » pendant la montée, nous a été suggérée grâce à la comparaison des relevés pathologiques de 38 cas spontanés répartis dans le Gard, l'Ardèche et la Lozère. Nous citerons des exemples de chaque type de cas.

Dans une éducation de M. B. M., à Ruoms (Ardèche) nous avons pu assister, ayant été alertés par le propriétaire en mai 1952, aux diverses conséquences des anomalies microclimatiques. Ces dernières sont survenues le troisième jour du 5e âge et nous avons noté alors 31°C. et 92 p. 100 d'humidité relative au niveau de la quatrième claie. L'absence de vent était aggravée par l'impossibilité d'établir tout courant d'air dans les pièces d'élevage à cause de la disposition défavorable des ouvertures. Vingt-quatre heures après, débuta un cas typique de flacherie et celle-ci persista pendant le reste du 5e âge ainsi que durant la « montée ». Celle-ci devint irrégulière et s'échelonna sur 5 jours. Au cours des premières 24 heures de cette même période, des signes d'incapcité de débuter le filage du cocon apparurent chez de nombreux vers et, à partir du deuxième jour, des « vers courts » typiques recouvrirent toute la litière. A la fin de l'élevage on comptait une perte de 12 p. 100 due à la flacherie et une de 9 p. 100 due aux « vers courts ». Dans beaucoup de cas, il fut d'ailleurs difficile de définir une limite nette entre les deux affections car certaines larves mouraient de flacherie au cours de leur transformation en « vers courts ».

Nous avons suivi et analysé sur une dizaine de cas, et cela pendant plusieurs années, la correspondance ou l'indépendance des pertes dues à la « touffe » et aux « vers courts ».

L'élevage de M. G. J., à Pradons (Ardèche) en est un exemple. Depuis 50 ans les élevages de cet éducateur sont sujets à la flacherie. D'après les examens effectués en 1950 et 1951, il s'agit du type non infectieux dû aux conditions d'aération insuffisantes. La mortalité commence chaque année au 4e âge et elle augmente au cours de la période dite de la « grande frèze ». Nous avons noté en 1950 une perte de 5 p. 100, en 1951 de 3 p. 100 et en 1952 de 8 p. 100. Par opposition à ces dégâts, en 1949, 1953 et 1955, années où les facteurs climatiques furent favorables à l'aération naturelle même dans les locaux mal équipés, la maladie n'est pas apparue, ou dans des proportions très faibles ne dépassant pas 0,5 p. 100.

Nous avons noté aussi l'absence de « vers courts » en 1949 et 1955, un taux de 1 p. 100 en 1953 et des pertes de 3 p. 100 en 1950, 7 p. 100 en 1951, et 4 p. 100 en 1952.

La comparaison des deux séries d'observations met en relief une certaine correspondance entre les années avec pertes importantes par la flacherie et celles favorables à l'apparition des « vers courts ».

Nous avons également recherché les cas spontanés où une discrimination de la succession des affections en fonction du temps a pu se dégager.

Ces observations n'ont été réalisables que grâce à la possibilité d'atteindre les élevages dans les 2 à 4 heures après le déclenchement d'une maladie. C'est ainsi que nous avons assisté à l'évolution de la flacherie et surveillé de près la période suivant celle-ci. Nous citerons des cas typiques choisis parmi ceux contrôlés par des prises d'hémolymphe et des fixations histologiques effectuées sur place.

Dans un élevage de St. André-de-Majencoules (Gard) portant sur 60 grammes de graines Roustan Bagdad et réalisé selon la méthode précoce et rapide à 25°C., une flacherie typique survint au 5e âge le 27 mai 1953 et évolua durant cette journée et celle du lendemain. L'origine de cette affection remonte à 3 jours plutôt (journée particulièrement chaude marquée par un orage survenu à 13 heures).

— Micro-climat au niveau de la deuxième claie : 26°C, 92 p. 100 d'humidité relative.

— Micro-climat au niveau de la quatrième claie : 32°C, 92 p. 100 d'humidité relative.

L'activation de l'aération grâce à de puissants ventilateurs amenant de la cave un courant d'air à 20°C, et un refroidissement du temps à partir du 28 mai, ont stoppé l'évolution de la flacherie, et réduit les pertes importantes qui seraient survenues à la montée.

Les observations poursuivies sur place tous les jours malgré la disparition presque totale de la flacherie nous ont permis d'assister à l'évolution d'autres phénomènes pathologiques. En effet, le deuxième jour de la montée, environ 1/4 des vers commence la confection du cocon. Ce même jour, dans la litière, apparaissent des vers « tapissiers » qui dispersent leur soie horizontalement sur les feuilles. Leur nombre va en augmentant et à ceux-ci s'ajoutent des vers restant également dans la litière sans émettre de soie. Les deux catégories se raccourcissent et mesurent 32 à 36 mm sur 9 à 10 mm. Ils présentent toutes les caractéristiques de l'état « ver court » et au moment du déramage ils totalisent 38 p. 100 des pertes.

Autre exemple en 1949, aux Plantiers (Gard) Nous sommes alertés en raison de l'apparition soudaine d'une flacherie dans un élevage de 90 grammes d'œufs de la race Roustan Gros Var.

La maladie a commencé 3 jours après la 4e mue et son origine peut être recherchée dans un manque d'aération et un excès de chauffage au moment de la sortie de mue (30°C pendant 4 heures au niveau des vers). Cette cause étant peu accentuée la flacherie n'a pas pris une extension grave. Les pertes ont atteints un maximum le deuxième jour de la maladie, puis ont diminué le troisième et sont devenues insignifiantes

à partir du quatrième jour. L'ensemble des pertes de l'élevage atteint 0, 8 p. 100.

Or, le rendement définitif n'a pas été en rapport avec cette faible perte. 120 kg de cocons, soit 40 kg à l'once (30 grammes) ou 1,300 kg au gramme d'œufs mis en incubation était un rendement bien inférieur à celui qu'avait habituellement l'éducateur (2,300 kg à 2,600 kg au gramme). La raison de cette différence ressort de nos relevés pathologiques journaliers. Ainsi 12 heures après le commencement de la « montée » générale, la litière se recouvrit de « vers courts » dispersant leur soie horizontalement et 24 heures plus tard, celle-ci se transformait en une masse soyeuse, brillante et cohérente comparable à un morceau de tissu. Au jour du déramage, on totalisait 11 p. 100 de « vers courts » nus et 7 p. 100 de cocons inachevés donc inutilisables.

Grâce à ces exemples de flacherie spontanée, nous avons pu en suivre les conséquences au moment de la montée et assister à l'évolution en « vers courts ». Il faut noter le peu de gravité de la flacherie ainsi que son arrêt progressif. Un état de prédisposition s'est ainsi créé car au-dessus d'un certain degré, la flacherie entraîne elle-même un effet léthal.

Au cours de ces observations la difficulté était d'avoir des témoins valables. Il est en effet impossible de prévoir l'apparition spontanée des cas d'asphyxie temporaire au cours des élevages individuels ou coopératifs. Toutefois, nous avons pu surveiller un certain nombre d'élevages dans lesquels d'après nos observations antérieures, on avait le plus de chances de voir apparaître cette affection. Nous avons pu alors obtenir de la part des éleveurs le transfert, dans des locaux éloignés de la magnanerie, d'une partie de l'éducation au moment de la 4^{e} mue. Par ce stratagème, nous avons obtenu des témoins comparables ne subissant pas le déclenchement de la flacherie dans le cas où les conditions atmosphériques limiteraient leur effet à la magnanerie principale. Naturellement il fallait compter ici sur la possibilité d'un échec au cas où la flacherie spontanée n'apparaîtrait pas dans la magnanerie visée. Au cours des saisons séricicoles 1951 et 1952, nous avons pu assister à l'évolution de la flacherie dans 19 cas portant sur 11 de ces magnaneries. Deux cas sont décrits ci-dessous.

Dans la magnanerie de M. L. B., à Mialet (Gard) la flacherie non infectieuse apparaît régulièrement depuis 1947. En 1952, les 3 onces de vers de race Roustan Bagdad, sans maladie jusqu'à la 4^{e} mue furent à ce moment là partagées en deux lots. Soixante-quinze grammes restèrent sur place et 15 grammes furent transportés dans un bâtiment situé au côté nord de la ferme. Les deux parties furent traitées de la même façon (feuille, nombre de repas, nombre de délitages). Or, le troisième jour du 5^{e} âge, les 2 onces 1/2 restées dans la pièce mal aérée présentèrent des signes de flacherie et la maladie s'est maintenue pendant tout le restant

de la vie larvaire. Dans le second lot, les pertes par flacherie n'atteignirent que 0,9 p. 100. Le comptage des « vers courts » révéla 6 p. 100 de pertes dans la première fraction de l'élevage, et 17 Vers seulement dans la seconde.

En mai 1951, dans une partie de l'élevage (totalité : 1 once race Agniel) de M. M. B., à St-Alban-sous-Sampzon (Ardèche) se trouvant dans une magnanerie plafonnée, une asphyxie temporaire se produisit après un orage précédé d'un temps très chaud sans mouvement d'air. Par contre, 15 grammes de graines de même race élevés dans un hangar du même bâtiment furent indemnes. La montée de cette fraction eut lieu en deux jours et on ne compta que 21 « vers courts ». Dans le premier lot au contraire, cette période s'étala sur 5 jours avec pour les vers, de grandes difficultés à se déplacer et il fut dénombré 6.220 « vers courts » typiques, soit une perte de 28 p. 100.

L'ensemble des observations portant sur des élevages partagés et dont nous venons de décrire deux exemples, renforce nos premières conclusions au sujet des rapports pouvant exister entre une asphyxie temporaire au cours du 5e âge et l'état « ver court » au moment de la montée. L'examen de ces rapports par la voie expérimentale était amplement justifié.

Grasserie. « Vers courts ».

De nombreuses observations séricicoles signalent une relation entre l'apparition tardive de la grasserie au cours du 5e âge et les « vers courts ».

Nous-mêmes, avons pu noter dans les magnaneries des cas comparables aux exemples que nous allons donner et qui ont été choisis parmi les plus typiques.

Dans l'élevage de M. B. G., à Lagorce (Ardèche), portant en 1950 sur deux onces de race Roustan Bagdad, la polyèdrie apparaît au 4e âge et se maintient à un taux faible ne dépassant pas une perte de 26 vers par jour. Au moment de la montée, les cas de virose augmentent ce qui est normal. Les pertes en « vers courts » (4 p. 100) ne sont pas très élevées non plus. Cependant l'examen microscopique de vers en prénymphose et de « vers courts » (1 000 individus par catégorie prélevés au hasard) a révélé des corps d'inclusion dans les cellules adipeuses et sanguines, chez 1 p. 100 des larves de la première catégorie et chez 57 p. 100 de la deuxième.

Dans cinq autres élevages atteints de polyèdrie les examens de 1 000 larves ont montré parmi les vers montant normalement, les pourcentages suivants d'individus portant des lésions virales : 0,2, 0,5, 1, 1,2, 0,8. Les « vers courts » prélevés également au hasard et en nombre comparable ont présenté les proportions suivantes de virose : 55, 42, 85, 61 et 67 p. 100.

Ces chiffres montrent la possibilité d'une action de la polyèdrie favorisant l'apparition des « vers courts ».

Nous voyons par ailleurs que dans certaines éducations décimées par la grasserie, les « vers courts » sont apparus en faible proportion. Nous avons vérifié ensuite que chaque fois que les vers sont au moment de la montée en état avancé de virose, la mortalité a lieu sous forme de grasserie généralisée. Ce n'est que dans les cas où les altérations sont peu développées que les « vers courts » apparaissent. Ceci est lié à l'évolution rapide de la grasserie dès qu'elle atteint un certain degré de généralisation des lésions.

Pébrine. « Vers courts ».

Au milieu du XIX^e^ siècle, période critique pour la sériciculture, l'étiologie du fléau mondial atteignant le Ver à soie était confuse à cause de l'assimilation de toutes les maladies en une seule : la nosémose. L'un des grands mérites, généralement ignoré, de PASTEUR lors de ses études sur les maladies du Ver à soie (1865 à 1870) est d'avoir établi une distinction entre prébrine et flacherie.

Dans les travaux séricicoles de cette époque on retrouve parmi les symptômes de l'épizootie les caractéristiques des « vers courts ». On n'a pas l'impression que les « vers courts » étaient aussi confondus avec la pébrine que la flacherie. Cependant le fait de mentionner ensemble les deux affections montre que les éleveurs ont observé une certaine coexistence de celles-ci.

Nous-mêmes, avons pu effectuer des observations à ce sujet sur un cas spontané de pébrine malgré la disparition de celle-ci en France. En 1949, une épizootie de pébrine s'est déclarée dans l'élevage de M. L. T. à Alès, épizootie amenée par une reproduction non soumise à contrôle. Une partie des vers a été conservée pour observation, jusqu'à l'éclosion des papillons. La nosémose a continué à se manifester à tous les âges, mais d'une façon assez réduite et sur 2 000 vers partant de la troisième mue on n'a noté qu'une mortalité de 82 larves jusqu'au déramage, chrysalides y comprises. Au moment de la « montée » un nombre élevé de « vers courts » est apparu totalisant 7 p. 100 de perte. Étant dans l'impossibilité, dans le cas de cette maladie exceptionnelle et spontanée, de travailler avec des témoins valables et comparables, il nous a été difficile de nous prononcer sur la valeur de l'apparition importante des « vers courts ». Nous n'avons porté une attention au phénomène qu'après avoir connu l'opinion des bacologues italiens, hongrois et iraniens sur des observations semblables.

Cet ensemble nous a fait supposer un rapport entre certaines maladies primaires et l'apparition secondaire des « vers courts ». L'étude expérimentale de ce rapport a été ainsi envisagée.

REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE DE COMPLEXES ENTRE AFFECTIONS PRIMAIRES ET « VERS COURTS »

Les observations sur les élevages de production dont nous venons de citer quelques exemples ont attiré l'attention sur l'influence de plusieurs affections pathologiques dans la formation de « vers courts » au moment de la montée. Pour l'analyse expérimentale, nous avons retenu trois types d'affections primaires de natures différentes. Ainsi, seront examinés successivement les effets d'une infection virale due à *Borrelina bombycis* PAIL. (*a*), d'un processus physiopathologique dû à des troubles respiratoire (*b*) et enfin d'une sporozoonose due à *Nosema bombycis* NAG. (*c*).

a) Pour le premier type, l'infection expérimentale est obtenue par l'ingestion pendant 3 heures de feuilles de mûrier souillées d'une suspension de corps d'inclusion de virus dont la concentration est préalablement ramenée à 1 000 000 d'éléments par mm^3 d'eau. L'évolution de la virose étant d'abord lente puis très rapide à partir de la phase de généralisation, il était à prévoir que l'éloignement de cette dernière phase du moment de la nymphose jouerait un certain rôle dans la formation des « vers courts », avec l'éventualité d'une mortalité précoce. C'est pour cette raison que les infections ont été effectuées à trois moments différents calculés d'après l'évolution des lésions en fonction de la température. Un lot de 1 000 larves est infecté deux jours après la sortie de la 4^e mue, un deuxième de même importance le 5^e jour et un troisième le 7^e jour du 5^e âge.

Dans chaque cas, la mortalité due à la virose suit la courbe normale caractéristique au 5^e âge. Dans le premier lot elle est déjà intense deux jours avant la montée, dans le second, elle se généralise pendant cette période et dans le troisième elle est encore à ce moment-là au stade sporadique.

Chez les témoins on ne totalise que 0,5 p. 100 de « vers courts ». Dans les trois lots traités on observe chaque fois une augmentation de cet état pathologique, mais les modalités d'apparition diffèrent selon les lots. D'après les données du tableau V une plus forte intensité caractérise le lot dans lequel la virose est en voie de généralisaton. La maladie très avancée semble moins influencer la formation des « vers courts » tandis que la polyèdrie faiblement développée entraîne encore un certain effet.

Ces expériences montrent l'influence réelle de l'évolution d'une virose sur la formation des « vers courts » au moment de la montée. Elles soulignent le rôle important dans l'établissement d'un enchaînement, du moment de l'infection car de lui dépend la phase d'évolution au moment de la « montée ». Une virose peu avancée ne semble pouvoir influencer que faiblement la deuxième phase du complexe et le stade

caractérisé par des lyses tissulaires massives conserve définitivement le syndrome « polyèdrie » dont l'évolution est déjà trop rapide pour qu'une affection secondaire puisse se manifester.

b) La deuxième série expérimentale est constituée d'observations sur les dérangements de la respiration précédant la formation des « vers courts ». Ces observations ayant laissé supposer l'existence d'un rapport entre les deux états pathologiques, notre but a visé la reproduction des conditions atmosphériques enregistrées chez les cas spontanés. Cette réalisation est extrêmement difficile, car la « touffe », phénomène simple à première vue, ne s'installe que dans des conditions très spéciales. De telles difficultés ont arrêté les bacologues du début du siècle qui essayèrent d'obtenir expérimentalement l'état atmosphérique entraînant dans des conditions naturelles la flacherie avec tant de facilité. Nous avons d'abord mis au point une installation évitant le plus possible à l'intérieur d'une enceinte expérimentale, tout échange d'air par différence de température et permettant ainsi la création de matelas d'air horizontaux. Le principe de cet ensemble consiste en l'égalisation progressive de la température à l'aide d'étuves situées l'une dans l'autre et dont les détails sont mentionnés dans le chapitre « méthodes ».

TABLEAU V

Influence d'une infection virale à Borrelina bombycis *sur la formation des « vers courts » chez* Bombyx mori.

Lots de 1.000 larves	Relevé au 8e jour de la montée						
	Larves saines	Larves avec symptômes de virose	" Vers courts "	Cocons normaux	Cocons "fondus"	Divers	Perdus
Sans infection	39	9	5	920	15	7	5
Infection polyédrie 2e jour du 5e âge	21	588	61	170	130	25	5
Infection polyédrie 6e jour du 5e âge	17	360	212	230	40	32	19
Infection polyédrie 8e jour du 5e âge	24	82	106	577	190	19	2

Un lot de 5 000 larves de race Roustan 200-300, élevé à 22°C et 70 p. 100 d'humidité relative, est partagé en deux le sixième jour du 5e âge. La première moitié du lot est placée dans une chambre climatisée à 26°C et 75 p. 100 d'humidité relative avec une aération continue de 180 cm³ à l'heure. La deuxième moitié est transportée au même moment dans l'enceinte centrale de l'installation décrite plus haut et dont la température est identique à celle de la pièce aérée. Après fermeture

l'humidité monte rapidement à 100 p. 100 et les matelas d'air dérangés par la présence des vers, se reconstituent une heure plus tard. L'asphyxie par manque d'air dans l'ensemble de l'enceinte centrale n'entre pas en jeu car le volume d'air correspond à 10 fois la quantité d'air nécessaire à la survie, compte tenu de l'effet de la litière, pendant la durée de l'expérience. Chaque ver dispose d'une surface de 20,16 cm^3 et d'un volume d'air de 1 249,99 cm^3. Le dérangement respiratoire ne s'établit que grâce au micro-climat des vers serrés sur un même plan horizontal. Les larves séjournent 16 heures dans ces conditions et sont ensuite transportées avec leurs témoins dans une pièce d'élevage à 22°C et 70 p. 100 d'humidité relative.

L'évolution de la « montée » et de la nymphose se déroule différemment dans les deux lots. Dans celui n'ayant pas subi l'effet de la « touffe », le début de la confection du cocon pour l'ensemble de la population, s'étend sur une période de 48 heures. Les maladies sont réduites (1,8 p. 100) et le nombre de « vers courts » insignifiant (0,8 p. 100). Dans l'autre lot, dès l'ouverture de l'enceinte à air confiné, des cas de diarrhée et de dysenterie apparaissent. La montée s'échelonne sur onze jours, les vers se déplacent peu et la plupart d'entre eux demeurent dans la litière. La dysenterie continue à évoluer pendant la « montée ». Le nombre de « vers courts » dispersant irrégulièrement leur soie est élevé (23 p. 100). Certains se transforment en chrysalides mais la grande majorité meurt à l'état de ver ou d'hémi-chrysalide.

D'autres expériences effectuées selon le même protocole ont donné des résultats comparables à ceux qui viennent d'être exposés. L'ensemble de ces essais confirme l'existence de rapports entre les processus pathologiques déclenchés par la « touffe » et la formation des « vers courts ». La comparaison des moments d'intervention de la première phase, montre que les altérations immédiates du dérangement de la respiration influent beaucoup sur l'apparition des « vers courts ». La dysenterie avec *Streptococcus bombycis* augmente l'effet prédisposant. Le moment précis de la « touffe » paraît être de première importance, car plus il est proche de la 4e mue, plus l'intensité d'apparition des « vers courts » diminue.

Un deuxième principe expérimental consiste en la recherche de l'effet d'une asphyxie temporaire obtenue par la simple diminution d'oxygène dans une enceinte fermée. Pour réaliser cet état, nous avons dû définir par des essais préliminaires, les conditions atmosphériques, le volume d'air et les durées de séjour en vase clos correspondant à différents degrés d'asphyxie. Dans ce but, des vers au milieu du 5e âge, de race Roustan 200-300, sont placés individuellement dans des récipients hermétiques (variantes : volume d'air, température, durée de séjour). Un ver au 5e âge épuise à 30°C environ 10 cm^3 d'air au bout d'une heure. Une asphyxie est alors réalisée sans amener la mort du ver. En effet,

celui-ci recommence à respirer et à se déplacer, si au bout de ce laps de temps il est remis dans une circulation d'air normale. Sur le tableau VI sont reportées les différentes combinaisons des variantes.

De ces essais préliminaires, nous avons retenu pour des raisons d'ordre pratique, le séjour pendant 12 heures à 20°C dans une enceinte hermétique avec 100 cm³ d'air en plus du volume du ver. La larve en voie d'asphyxie une fois sortie de l'air épuisé reprend progressivement ses mouvements normaux. Une dysenterie se déclare ordinairement 24 heures plus tard. Cependant la vitesse de déplacement du ver n'est pas comparable

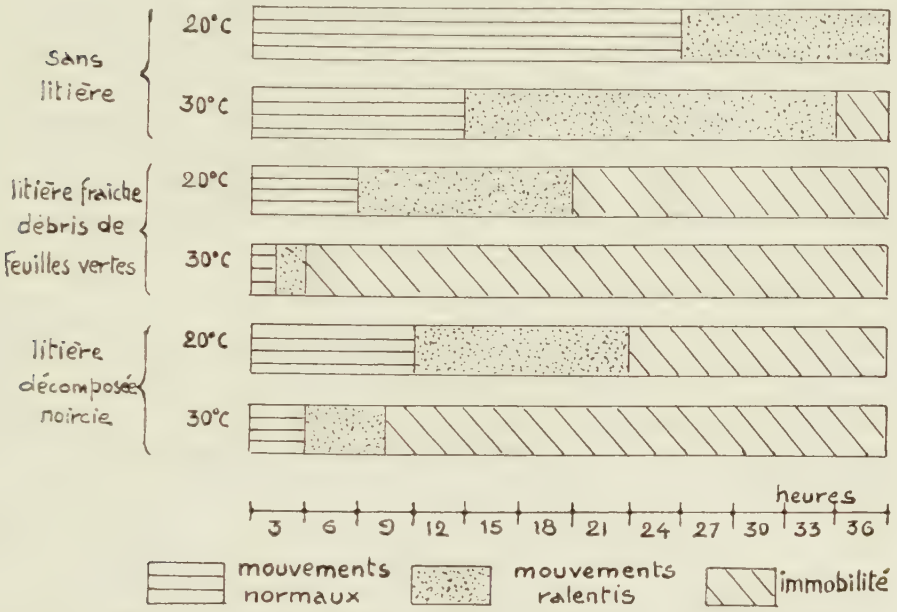


Fig. 35. — Effet de la litière sur l'asphyxie temporaire chez les larves de *B. mori* (5e âge). V. air : 250 cm³, V. substr. : 50 cm³.

à celle d'un ver normal et l'alimentation est également dérangée.

L'influence de l'asphyxie temporaire ne se traduit pas d'une façon homogène vis-à-vis de la formation des « vers courts ». En effet, au cours de nos premiers essais, dans lesquels l'âge des vers en expérience n'a pas été homogénéisé d'une façon précise, aucun effet constant n'a été enregistré. Par contre, pour les expériences relatées dans la figure 34, un effet très net se dégage. Un critère décisif réside en l'éloignement de l'intervention des conditions d'asphyxie d'une part de la 4e mue, d'autre part de la nymphose ; l'effet secondaire étant le plus prononcé quand l'asphyxie agit sur des vers proches de la « montée ».

Un essai complémentaire nous a permis d'éclaircir un aspect particulier du complexe. La litière des éducations des Vers à soie (débris de

feuilles s'accumulant sous les vers) a souvent été accusée de jouer un rôle dans l'établissement des troubles respiratoires, surtout au 5e âge quand elle s'entasse sur une épaisseur pouvant dépasser 10 cm. Afin de nous rapprocher de ces conditions, fréquentes dans la pratique séricicole, nous avons essayé d'examiner l'influence de l'asphyxie en présence de la litière. La figure 35 donne la structure et les résultats de l'un des essais. Il s'agit de Vers à soie de race Roustan 200-300 au 4e jour du 5e âge, placés dans des enceintes hermétiques ayant chacune un volume total de 300 cm³ occupé partiellement par 50 cm³ de substratum et renfermant 250 cm³ d'air. Chaque catégorie a été examinée à 20 et 30°C. Dans tous les cas l'épuisement de l'air et l'asphyxie sont accélérés en présence de la litière. Les calculs montrent que 15 grammes de litière fraîche constituée de débris de feuilles de mûrier, épuise à elle seule, à 30°C près de 100 cm³ d'air en une heure, soit 10 fois plus qu'un ver au 5e âge dans les mêmes conditions de température. Cette quantité de litière correspond à celle que doit occuper théoriquement un Ver à soie au 5e âge dans un élevage normal de production. La litière en décomposition a un effet semblable mais plus faible.

TABLEAU VI

Conditions d'une asphyxie temporaire pouvant entraîner l'état « ver court » chez les larves de B. mori *au 5e âge.*

Volume d'air en cm³	Temp. °C	État de la larve en fonction de la durée du séjour (en heures)					
		1	6	12	18	24	36
25	20	ralenti	immobile	immobile			
	30	immobile		mort			
50	20	normal	ralenti				
	30	ralenti	ralenti				
100	20		ralenti	immobile			
	30						
200	20				ralenti	immobile	
	30				immobile	mort	
300	20	normal	normal		ralenti	ralenti	ralenti
	30	normal	normal	ralenti	ralenti	immobile	immobile

L'effet de l'asphyxie, accéléré par l'action de la litière, sur la formation des « vers courts » se traduit par les mêmes processus que sans litière, mais l'évolution de l'état pathologique est plus prononcée. D'après ces expériences, la litière peut jouer un rôle important dans les éducations pour favoriser l'apparition des « vers courts ». Ceci est souligné par le fait que l'accumulation la plus intense de la litière et le moment critique de la préparation des « vers courts » coïncident et correspondent à la fin du 5e âge.

c) La troisième série de recherches expérimentales envisage la repro-

duction de l'influence d'une affection à sporozoaires. Buonocore (1937) en recherchant les raisons de l'impossibilité d'émission de soie par des Vers à soie « mûrs » cite les altérations de la glande sérigène dues à l'action de *Nosema bombycis*. Même des travaux anciens (Quatrefages, 1859) mentionnent déjà les anomalies survenues au moment de la montée dans des élevages pébrinés.

Pour les essais de reproduction expérimentale du complexe, nous n'avons pas procédé à l'infection « per os » avec spores de *N. bombycis*. Bien que l'infection réussisse par cette voie, elle est irrégulière. Nous avons préféré créer un état infectieux par la ponte de départ. Elles proviennent du grainage « cellulaire » (Pasteur, 1870 ; Mozziconacci, 1911) d'un lot dont la moitié a été préalablement infectée. Pour les témoins on utilise

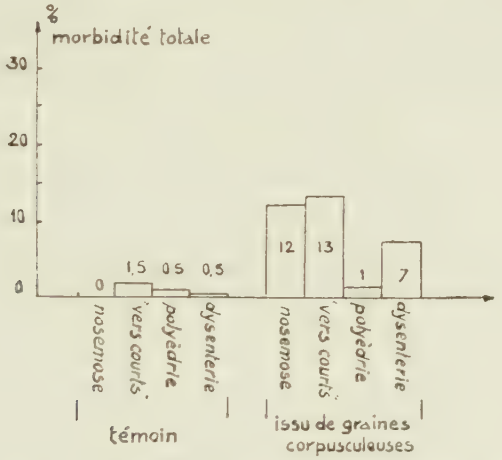


Fig. 36. — Effet d'une infection à *Nosema bombycis* Näg. sur la formation de « Vers courts ».

les pontes saines et pour les lots pébrinés on retient celles des papillons porteurs de *Nosema*. L'élevage témoin ne présente aucun cas de nosémose pendant toute la vie larvaire. La mortalité totale s'élevant à 0,8 p. 100, est due à la polyèdrie et à quelques cas de dysenterie. Dans l'élevage (effectué en pièce isolée avec précautions et désinfections spéciales) issu des graines corpusculeuses, la pébrine se manifeste pendant toute la (vie larvaire) 12 p. 100. Une partie de ces vers présente les symptômes de la flacherie car la pébrine favorise l'un des types de cette maladie (cet enchaînement avec son mécanisme de liaisons caractéristiques sera traité dans un travail ultérieur).

L'effet secondaire de la nosémose se manifeste au moment de la montée. La figure 36 signale un nombre normal de « vers courts » dans le lot témoin. Dans le lot corpusculeux, la préparation à la nymphose est irrégulière et s'échelonne sur plus de 6 jours. La plupart des vers

« monte » sur les cabanes et sans commencer le cocon descend et se déplace dans la litière ; d'autres restent sur place. La dispersion irrégulière de la soie (vers « tapissiers »), assez courante chez les vers dérangés par des influences atmosphériques, est réduite. Dix jours après la montée, la proportion de « vers courts » s'élève à 13 p. 100.

Le même type d'expérience a été effectué sur les races Agniel et Delmas soufrés, et les mêmes phénomènes ont été constatés mais avec des différences de valeur (20 p. 100 de « vers courts » dans certains lots, 3 p. 100 dans d'autres).

Ces données expérimentales montrent que l'état endémique de *Nosema bombycis* dans une population favorise l'apparition des « vers courts » à la « montée » et des rapports chiffrables se dégagent entre les deux affections. Une particularité de ces rapports réside dans le fait que l'infection primaire est susceptible d'amener la deuxième phase du complexe non seulement dans la génération infectée, mais également à la fin de la vie larvaire de la génération suivante.

PATHOGÉNÈSE DU COMPLEXE

Les expériences relatées, montrent l'existence de rapports entre certaines affections pathologiques d'origine infectieuse ou physiologique et la formation des « vers courts ». Afin d'étudier le mécanisme de la succession des affections, nous avons procédé à l'examen des organes et des tissus.

Dans le cas des « vers courts », ces examens n'apportent pas de données aussi significatives que pour les autres types d'enchaînement. En effet, que l'état « ver court » soit consécutif à des effets thermiques, à une virose ou à une nosémose, les lésions sont comparables en ce qui concerne chacune de ces affections et l'état « ver court ».

C'est ainsi que l'on constate toujours le fractionnement des aliments dans le tube digestif, la formation de méconium riche en urates et l'activité de la sécrétion intestinale.

Le tissu adipeux des « vers courts » issus d'une polyèdrie montre les lésions nucléaires caractéristiques de la virose (lyse chromatinienne, hypertrophie nucléaire, formation de corps d'inclusion). La lyse tissulaire et la libération des corps d'inclusion dans la cavité générale se produisent rarement. L'ensemble des « vers courts » virosés se trouve plutôt à un stade moyen de la maladie.

Les « vers courts » apparus après une asphyxie partielle se distinguent par la vacuolisation du cytoplasme des hémocytes et par la richesse en streptocoques de l'intestin moyen.

Enfin, ceux provenant d'une nosémose présentent des signes d'atrophie du tissu adipeux et des glandes séricigènes. Histologiquement l'épi-

thélium intestinal, l'épiderme et les glandes séricigènes présentent dans leur cytoplasme des spores de pébrine en nombre variable. La glande séricigène est atteinte dans toute la longueur du réservoir et de la partie conductrice. On remarque la précocité des lésions dans les cellules glandulaires.

Tous ces signes mis en évidence sont propres à l'une des maladies primaires et à l'état « ver court », les phases intermédiaires ne sont pas histologiquement marquées.

Nous avons alors recherché les facteurs physiologiques directs assurant l'évolution des « vers courts ».

Le cas à déterminisme absolu est l'absence d'émission de soie. L'impossibilité intrinsèque en est le type le plus simple et elle nous entraîne en physiologie expérimentale où elle a été réalisée à plusieurs reprises. L'obstruction de la filière par des techniques diverses (Lesperon, 1937 ; Allegret, 1948, 1951, 1954) détermine un état que nous considérons comme très voisin de celui défini en pathologie sous le nom de « ver court ». Ces expériences très précieuses en physiologie, ne sont que des points de départ vers la définition d'une pathogénèse.

Les liens directs avec l'impossibilité d'émission de la soie, peuvent être établis au point de vue mécanisme d'action pour l'effet de prédisposition par la nosémose. En effet, lorsque les « vers courts » ont été obtenus consécutivement à cette maladie, nous avons noté la quantité réduite de la soie dispersée. Les examens individuels ont également révélé la réduction de l'émission de fil. Enfin, par l'histopathologie résumée plus haut, on a vu les altérations des glandes séricigènes, ce qui justifie les troubles considérables de l'émission de soie. Dans ce cas, nous pouvons établir un parallélisme entre l'obtention expérimentale de « vers courts » par l'absence ou le dérangement de l'émission de soie et les lésions dues à la pébrine provoquant des difficultés analogues. Pour cet enchaînement, les lésions de la glande séricigène semblent constituer le facteur intermédiaire du mécanisme.

Pour les autres cas d'enchaînement, l'émission de la soie ne semble pas être dérangée à un tel point ; aussi, avons-nous envisagé d'autres types d'expériences pour rechercher le facteur intermédiaire. Pour l'un des plus typiques on dispose des « vers mûrs » sur une surface plane de 4 m_2 de telle sorte qu'ils ne puissent pas fixer de fils entre deux points opposés. Cet « état d'impossibilité » est maintenu pendant des temps croissants afin d'apprécier son rôle en fonction de celui-ci. Selon les données de la figure 37, les vers se trouvant dans ces conditions parcourent d'abord des surfaces considérables. Leur vitesse diminue ensuite progressivement et leurs mouvements sont de plus en plus réduits. En même temps, une transformation morphologique a lieu vers la forme typique de « ver court ». Au bout de 30 heures à 20°C, les vers sont à un

stade de paralysie avancée et se présentent sous forme de « vers courts » typiques.

Si l'on ne soumet les vers à ces conditions que pendant une fraction de la durée de leur transformation, ils peuvent recommencer leur cocon mais d'autant plus difficilement qu'ils demeurent plus longtemps dans « l'état d'impossibilité ».

Posons les vers empêchés pendant divers laps de temps de fixer leur soie et présentant par suite les stades successifs de la transformation en « vers courts », dans trois catégories de conditions au point de vue

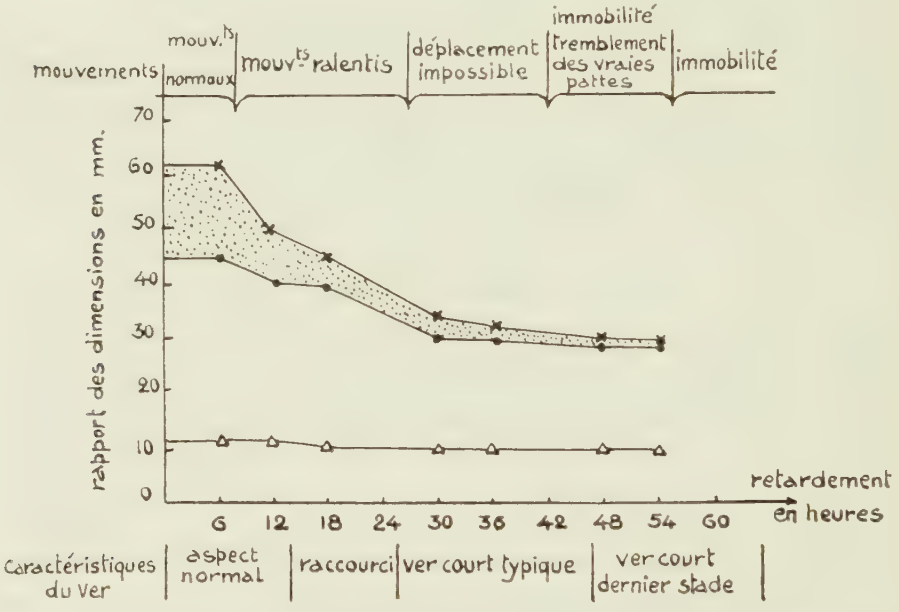


FIG. 37. — Effet sur larves de *B. mori* du retardement de la fixation de soie au moment de la montée. (moyenne sur 50 exemplaires) : × longueur en état d'allongement d'une larve. — ● longueur en état de contraction d'une larve. — △ largeur du 5e segment (état d'allongement).

facilités d'atteindre un point de fixation. Dans la première on dresse des « cabanes » de bois dont les tiges verticales sont distantes de 20 cm. les unes des autres et dont la hauteur est de 50 cm. Ici les vers doivent normalement parcourir même dans le sens vertical, une distance importante avant de trouver l'endroit optimum pour la fixation de la blase du cocon. La deuxième catégorie est constituée d'un système semblable mais dont la hauteur n'est que de 10 cm ce qui réduit consédirablement pour les vers, l'effort nécessaire. Enfin, dans le troisième cas, nous donnons aux vers le maximum de facilités pour la fixation des fils sur place en les posant dans des tubes de papier de diamètres légèrement supérieurs à ceux des cocons. Les relevés de tous les éléments le huitième jour de la montée (tableau VII) montrent d'une façon nette la diminution des

cocons normaux et même des cocons inachevés au fur et à mesure que les vers sont retardés dans la fixation de leur soie. D'un autre côté, parmi les vers dérangés pendant un même laps de temps, l'effort à fournir et le déplacement à effectuer pour trouver l'endroit favorable à la confection du cocon sont des facteurs décisifs pour qu'ils se transforment en chrysalides à l'intérieur d'un cocon ou pour qu'ils restent « vers courts ». En effet, en donnant aux vers la possibilité immédiate de fixer leurs premiers fils sans avoir à se déplacer, on peut doubler ou tripler la proportion de ceux susceptibles de faire des cocons (comparativement à ceux devant se déplacer en hauteur).

TABLEAU VII

Influence de l'évolution de l'état « ver court » sur la faculté de confectionner le cocon.

Retardement de fixation de la soie en heures	0	18	30	48	54
Caractéristiques de la larve	Ver normal L. 61 mm.	Mouvements ralentis ver raccourci L. 45 mm.	" Ver court " typique L. 32 mm.	" Ver court " très avancé immobile L. 31 mm.	" Ver court " très avancé immobile L. 31 mm.
Faculté de formation de cocon en % sur lots de 100 larves					
cabanne haute					
cocons normaux	90	34	10	5	1
cocons inachevés	7	22	23	19	7
vers sans cocons	3	44	67	76	92
cabanne basse					
cocons normaux	88	49	29	12	63
cocons inachevés	8	31	37	31	18
vers sans cocons	4	10	34	57	79
tube papier					
cocons normaux	88	60	41	18	3
cocons inachevés	7	30	39	43	20
vers sans cocons	5	10	20	39	77

De cet ensemble se dégage l'importance de la notion d'empêchement temporaire et celle de la durée de cet empêchement. C'est grâce à ces données que nous pensons approcher le facteur intermédiaire, recherché en vue de préciser le mode d'action des phases primaires du complexe amenant l'état « ver court ». Nous retenons deux phénomènes parallèles.

D'une part, plusieurs facteurs peuvent empêcher l'acte physiologique de la fixation du fil de soie et de la formation du cocon. Expérimentalement, on arrive à réaliser une impossibilité très poussée.

D'autre part, les mêmes facteurs n'arrêtent nullement l'évolution d'un autre processus physiologique, celui de la progression vers la nymphose. Les vers ne pouvant pas commencer leur cocon se raccourcissent progressivement, perdent leurs facultés de déplacement et sont de plus

en plus paralysés. Ce processus dont la vitesse et la rapidité sont fonction de la température, conduit à l'état d'incapacité totale de déplacement avec limitation des mouvements à ceux de la tête et au tremblement des vraies pattes.

Il devient évident que plus l'impossibilité d'ébaucher le cocon se prolonge à partir du moment où les vers se « vident » plus la paralysie avance et par conséquent la chance de pouvoir se déplacer jusqu'à un endroit propice à cette opération (le ver est à ce sujet très exigeant) diminue. Le ver devenant ainsi de moins en moins capable de faire un cocon régulier progresse vers l'état « ver court ».

Ce décalage entre les deux processus physiologiques explique la nature des liens entre la première phase du complexe : la cause du retardement et la deuxième : l'évolution des « vers courts ». En effet, de nombreux processus pathologiques semblent susceptibles de mettre les vers dans l'impossibilité momentanée de commencer leur cocon en temps nécessaire. Parmi les cas étudiés plus haut, la grasserie crée non seulement des difficultés dans l'émission de la soie (Susuki, 1951), mais entrave la faculté de déplacement. Bien qu'apparemment les lésions de la virose excitent les vers atteints, cet état n'est pas définitif et les déplacements prolongés deviennent rares. La distance moyenne parcourue par un ver au début de la généralisation de la polyèdrie est en effet de 8 cm en 15 minutes contre 180 cm pour les vers sains (moyennes établies sur 100 larves de chaque catégorie au moment de la montée).

Une asphyxie temporaire avec dysenterie amène un ralentissement général des fonctions organiques et particulièrement une réduction du déplacement et une immobilité prolongée. Nous soulignons ici le cas particulier d'un retardement de même nature mais plus direct. Ainsi, il arrive fréquemment qu'une « touffe » s'établisse dans les pièces d'élevage pendant la période de la « montée ». Les vers se trouvent alors directement sous l'influence de l'effet paralysant de cet état atmosphérique et arrêtent toute activité même s'ils sont en voie de déplacement vertical en vue de fixer leurs premiers fils. Le décalage s'établit alors car leur métamorphose continue. Comparons ces remarques avec la crainte qu'ont les sériciculteurs quand dans leurs élevages le moment de la « montée » coïncide avec un orage avec décharges électriques et baisse de la pression atmosphérique.

CONCLUSIONS

Une étude étiologique de l'état « ver court », affection importante du Ver à Soie, a montré que celle-ci n'est pas une entité pathologique. Elle constitue un état physiologique particulier et son étiologie doit être recherchée dans des processus précédant ce syndrome et différant de celui-ci.

Les observations effectuées pendant 5 ans dans les élevages de production ont révélé plusieurs types de maladies dont la présence amène souvent l'apparition des « vers courts ». La virose à *Borrelina*, une asphyxie partielle et temporaire et la pébrine à *Nosema bombycis* ont été reconnues comme telles.

Une étude expérimentale a été appelée à mettre en évidence les rapports entre ces affections et la formation des « vers courts ».

L'infection virale montre un effet favorisant dans l'apparition des « vers courts », effet dont l'intensité est en rapport avec le moment de l'infection. Si la virose se trouve au moment de la « montée » à la phase de la lyse tissulaire, les symptômes de polyèdrie constituent le syndrome léthal. Dans le cas où la « montée » coïncide avec le début de la généralisation de la virose l'enchaînement s'établit plus efficacement.

L'asphyxie partielle et temporaire peut augmenter considérablement les cas de « vers courts », et l'efficacité de cet enchaînement est d'autant plus ressentie que la phase primaire est proche de la période de la prénymphose.

Enfin, l'infection à *Nosema* crée une prédisposition vis-à-vis de la formation des « vers courts », même si l'infection primaire précède la phase physiologique secondaire de plusieurs âges ou si elle se situe à la génération précédente.

L'étude du mécanisme de la pathogénèse ayant révélé des symptômes histologiques propres aux affections pimaires et à l'état « ver court », un facteur intermédiaire a été recherché.

En suivant l'effet progressivement prolongé de l'impossibilité artificielle de l'émission de soie et de la fixation des fils, l'importance de la durée et du degré de tels effets a été dégagée. Le facteur intermédiaire recherché est apparu comme un décalage créé par un empêchement même de courte durée ou partiel entre le début de la confection du cocon et la nymphose. En effet, ce dernier processus se poursuit sans aucun dérangement ou arrêt malgré l'intervention de phénomènes susceptibles d'empêcher ou retarder la production du cocon. Le ver non seulement se raccourcit progressivement, mais se paralyse et devient de moins en moins capable de fixer sa soie et de commencer son cocon. L'état « ver court » caractéristique apparaît alors.

Dans le cas de l'effet primaire de la pébrine, le mécanisme consiste en un empêchement très poussé dû à des lésions de la glande séricigène. La virose et les asphyxies temporaires diminuent seulement le déplacement et l'activité générale des vers. Ceux-ci tardent ainsi à fixer leurs fils ou à trouver un endroit pour commencer leur cocon tout en progressant vers la nymphose. Leur faculté de commencer le cocon diminue et se perd peu à peu.

Par la structure de la succession de deux et même trois phases du

processus, s'explique toute une série d'autres raisons primaires desquelles dépend l'apparition des « vers courts ».

En proposant aux sériciculteurs des méthodes de *prophylaxie* vis-à-vis de la *première phase* du complexe (à première vue étranger aux pertes dues aux « vers courts ») les dégâts dus aux « vers courts » ont été efficacement réduits dans les élevages de production.

Au point de vue *pathologie comparée*, cet exemple d'enchaînement montre comment des processus primaires de nature pathologique variée, peuvent amener une anomalie de nature physio-pathologique ressortant lors d'une crise de développement. Une infection ou une affection pathologique peuvent, si elles coïncident avec une période précise de la vie de l'Insecte, présenter un état pathologique qui ne se produirait pas à un autre moment.

Enfin, le fait d'avoir retrouvé l'état « ver court » chez divers *Lépidoptères dans la nature*, nous fait considérer celui-ci comme une forme de manifestation d'autres affections pathologiques préexistant d'une façon naturelle.

Chapitre VII

COMPLEXE TROUBLES MÉTABOLIQUES — VIROSE AIGUE

ORIGINE DE LA MISE EN ÉVIDENCE DU COMPLEXE. PROBLÈME DU ROLE DES FACTEURS ABIOTIQUES DANS L'ÉVOLUTION DES POLYEDRIES.

Le type d'enchaînement de maladies étudié est étroitement lié à l'évolution d'un problème de virologie comparée. Ce problème a eu comme départ diverses observations anciennes sur maladies d'Insectes qui furent ensuite reconnues d'origine virale. Il s'agit de l'apparition massive des affections appelées « Wilt diseases », « grasserie » ou « jaunisse », apparition qui dépend non seulement de la contagion mais aussi de facteurs abiotiques et de l'alimentation.

Les premières remarques à ce sujet sont relatives au Ver à Soie. En effet, on a été amené, pour des raisons économiques, à étudier les affections entomopathologiques de cet Insecte. Il y a près de deux siècles, la grasserie, l'une des maladies principales du Ver à Soie, était attribuée à certaines conditions d'élevage mais on analysait aussi les facteurs atmosphériques et alimentaires susceptibles de la provoquer. Cela montre l'importance qu'ont attribuée les sériciculteurs à la dépendance de la grasserie des facteurs abiotiques. L'un des plus anciens, Boissier de Sauvages (1788) a noté l'apparition de cette maladie après l'incubation

des graines en atmosphère insuffisamment aérée. Il insiste également sur l'effet du froid pendant les mues.

Dans le peu d'ouvrages existant à cette époque au sujet des maladies des Insectes nuisibles aux cultures ou aux forêts, on peut également trouver des remarques relatives à l'apparition des formes aiguës de certaines affections reconnues plus tard comme viroses. (Par exemple Wipfelkrankheit de *Lymantria monacha* L. Von Tubeuf, 1892). L'influence spectaculaire de l'insolation a particulièrement retenu l'attention de Escherich et Miyajima (1911) ainsi que de Wahl (1912) qui distinguent par opposition à la forme aiguë de ces maladies, une période latente ralentie.

Cette dépendance des polyèdries d'autres facteurs que l'infection, est à nouveau précisée au moment où la virologie commence à se développer d'une façon générale et la nature virale des polyèdries est alors envisagée. Acqua, grand spécialiste en pratique séricicole émet l'idée de la génération spontanée de la grasserie. Il cite l'effet de la mauvaise incubation, du froid et de l'alimentation et il signale un rapport entre son apparition et la mue précédente. Il souligne l'hypothèse d'un virus autocatalytique qui se synthétiserait à l'intérieur des cellules, sans présence préalable d'éléments spécifiques. Il prévoit un processus consistant en la formation de produits de décomposition dans des cellules altérées par une action non parasitaire. Ce sont ces produits de décomposition qui au contact des cellules saines causeraient des altérations analogues. Il souligne que cette substance ne constitue pas un principe organisé vivant (Acqua, 1918).

Ces idées se sont trouvées en opposition avec celles de la plupart des bacologues de l'époque, et notamment avec celles de Paillot (1928) qui était sur la voie de purifier le virus de la polyèdrie (Paillot, Gratia, 1938 ; Gratia, Paillot, 1939) et a attribué l'apparition de la grasserie uniquement à une contagion directe et à une transmission héréditaire du virus.

A partir de cette époque les auteurs traitant des maladies à virus des Insectes se réfèrent sur ce point délicat, soit aux données de Paillot sur la contagion directe, soit à celles d'Acqua concernant la formation spontanée du virus.

Ainsi Veneroso (1934), constatant l'augmentation des cas de grasserie après l'ingestion de feuilles souillées d'émanations de fluorures provenant d'une usine, cite les idées de l'auteur italien, alors que Roegner-Aust (1947) remarque chez les individus sains certains signes cytologiques laissant supposer une transmission héréditaire du virus sans extérioriration.

Récemment certains travaux japonais ont fait part d'idées rejoignant celles d'Acqua. Yamafuji en collaboration avec Akita, Yoshi-

HARA, OMURA, WADA, CHO, YUKI, SCHIROZU, SAKAMOTO, TOKUYASU, SO, SOO, SATO, IGANE, NAMBA, a annoncé en une série d'articles (1941, 1944, 1947 a, 1950, 1952) la production artificielle de virus de la polyèdrie chez *Bombyx mori* à la suite de l'alimentation avec certaines substances chimiques telles que l'hydroxylamine ou des nitrites. Le processus de la génèse des virus a été défini comme étant une polymérisaton des nulcéprotéines par le péroxyde d'hydrogène. Les étapes de l'apparition du virus lui-même seraient la nucléoprotéine normale, cette substance dénaturée, celle-ci regroupée, et en passant par la polymérisation aboutissant enfin à la molécule de virus (YAMAFUJI, 1952 a). En dehors des expériences faites sur des souches de Vers à Soie appartenant aux races industrielles, ce groupe de chercheurs annonce également pour soutenir cette thèse, l'obtention de virus dans une souche de Ver à Soie qu'il considère exempte de polyèdrie (YAMAFUJI, YOSHIHARA, OMURA, 1952).

De notre côté, ayant eu de nombreuses occasions d'observer de près des élevages individuels de Lépidoptères et ayant pu suivre des successions de générations en inbreeding, le problème des facteurs d'apparition des virus nous a préoccupé dès 1942. A cette époque, les données bibliographiques plutôt disparates n'ont pas fait apparaître les relations virologiques. C'est grâce à des contacts étroits avec les professeurs CSUKAS (Z.) (1), SZENT-GYORGYI (A.) (2) et GERLACH (F.) (3) que le sens de ces observations pour la compréhension des actions virales en général nous est apparu. Nous avons alors effectué des séries successives de travaux en vue de rechercher le mécanisme de l'influence des facteurs abiotiques sur la fluctuation de l'apparition des viroses chez les Lépidoptères.

OBSERVATIONS DE CAS SPONTANÉS DE VIROSES CONDITIONNÉES PAR DES EFFETS PRIMAIRES

La série la plus ancienne de nos observations, au cours desquelles un rapport de facteurs abiotiques vis-à-vis des viroses de Lépidoptères est apparu, concerne la fausse teigne de la ruche (*Galleria mellonella* L.). Plusieurs souches de ce Lépidoptère maintenues en élevage au laboratoire n'ont pas présenté la polyèdrie pendant 30 générations et ceci malgré divers systèmes de multiplication. Dans une première catégorie, la totalité de la population s'est reproduite sans contrôle des éclosions. Notre seul travail consistait à empêcher la surpopulation grâce à la division des pontes. Pour une deuxième série, les pontes ont été recueillies entre 48 et 96 heures après l'accouplement. D'autes ont été maintenues en inbreeding pendant environ 10 générations et ensuite en élevage massif

(1) Zootechnie comparée. — Fac. Agr. Budapest.
(2) Chimie biologique. Fac. Méd. Szeged.
(3) Epidémiologie. Fac. Véter. Vienne.

comme les précédentes. Enfin certaines ont été conservées en inbreeding d'une façon permanente.

Par contre, dans trois souches maintenues en élevage massif mais d'origines différentes, quelques cas de polyèdrie ont été notés dès la mise en élevage. Au bout de plusieurs générations une épizootie a décimé ces éducations et par la suite, malgré la désinfection des récipients d'élevage et des locaux, le changement d'aliment et l'élimination de tous les malades, l'affection conserva l'allure de faible enzootie. Cette première série d'observations a attiré notre attention sur certains faits non pris en considération à l'époque. Étant donné la conception du moment sur l'autocatalyse des virus (Acqua, 1929), lors de l'appréciation des facteurs abiotiques, la possibilité de l'absence de virose dans certaines populations n'avait pas été envisagée.

En suivant l'endémie de virose nous avons noté l'élévation de la courbe de polyèdrie lors d'une surpopulation. Cet accroissement aurait pu être imputé simplement à la contagion par suite de l'abondance des larves. Cependant les essais de vérification selon le principe de l'inversion des variantes (populations de densités normales, volumes d'air à la disposition des larves réduits pour certains lots) ont révélé l'augmentation de la polyèdrie en fonction des troubles respiratoires.

Des relations d'un autre ordre sont apparues sur le même Insecte en fonction de l'alimentation. Comme on le sait la cire pure ne permet pas un développement normal des larves de *Galleria*, mais contrairement aux prévisions, les lots ainsi alimentés ne présentaient pas un taux de polyèdrie particulièrement élevé. Cette carence n'a donc pas semblé être un facteur décisif dans la fluctuation de cette virose.

Nous nous arrêterons sur l'alimentation avec de la cire stérilisée, contenant des proportions importantes d'abeilles mortes et desséchées. Dans ce cas la virose a persisté à un niveau élevé (40 p .100) et la richesse en protéines de l'aliment a été prise en considération.

Le dernier point important de ces séries d'élevages est l'absence de polyèdrie dans certaines souches même alimentées avec de la cire mélangée à des abeilles mortes. Nous avons noté les difficultés de compatibilité de ces observations avec l'hypothèse de l'autocatalyse des virus de polyèdrie.

Les conditions d'alimentation spéciale pour les Lépidoptères phytophages ont permis de retenir d'autres facteurs. Sur *Vanessa urticae* L. les différences dans l'état physiologiques des feuilles de *Urticae dioica* ont été analysées quant à leurs effets sur les souches présentant régulièrement un faible taux de polyèdrie. (Une telle présence endémique a été constatée d'ailleurs chez toutes nos souches de provenances diverses). Deux modes d'alimentation ont favorisé l'augmentation de la polyèdrie (jusqu'à 20 p. 100). Le premier consiste en l'alimentation continue avec

des feuilles fanées contenant peu de chlorophylle et se trouvant en voie de jaunissement. Le deuxième est en rapport avec l'origine des orties utilisées comme nourriture. En effet, les larves des premiers âges, nourries avec des plantes provenant d'un sol argileux, donnent 15 à 18 p. 100 de polyèdrie alors que celles consommant les orties développées dans une terre arable limoneuse n'en présentent que 4 p. 100.

Des observations analogues ont été réunies au cours d'autres travaux personnels et de ceux effectués en collaboration.

Ainsi dans le cadre d'une analyse de croissance de *Bombyx mori* L. (Fraisse, 1953 b), nous avons constaté avec cet auteur que les larves nourries dès leur naissance avec des feuilles très mûres, présentent à la première mue une polyèdrie élevée et l'affection persiste pendant toute la vie larvaire. Les feuilles déclenchant cet effet sont par rapport aux feuilles jeunes, très riches en sels de calcium et ont des épidermes fortement cutinisés.

Les mêmes travaux ont fait ressortir d'autres relations paraissant à première vue en contradiction avec les précédentes. Ainsi au 5^{e} âge de la vie larvaire, des lots alimentés avec des feuilles très jeunes, riches en eau, ont présenté une virose très prononcée durant cet âge et pendant la nymphose.

Ces deux phénomènes ne sont en réalité pas contradictoires mais dus à des mécanismes différents, et les sériciculteurs savent depuis longtemps que les feuilles dures au premier âge ou les feuilles très tendres aux derniers sont autant de facteurs favorisant l'apparition de la grasserie.

Un autre type d'effet de l'aliment végétal sur l'évolution des viroses, a été mis en évidence chez le Lépidoptère polyphage *Lymantria dispar* L. (Vago, 1953 b). Lors d'une invasion importante de cet Insecte dans le département du Gard, s'étendant aussi bien aux forêts de chênes verts qu'aux plantations mixtes de chênes verts, platanes, mûriers, micocouliers et pêchers, la polyèdrie aiguë est apparue dans la proportion de 8 p. 100 parmi les larves vivant sur chênes verts, et de 42 p. 100 dans les plantations mixtes.

Au cours d'élevages réalisés sur *Quercus ilex, Castanea vulgaris, Platanus vulgaris, Prunus domestica, Morus alba* var. *tenuifolia et Prunus persica,* espèces attaquées au cours de cette invasion, les cas de virose à *Borrelina reprimens* Holmes dans les lots *Castanea* et *Morus* ont dépassé de 10 p. 100 les proportions observées dans les autres modes d'alimentation.

Plus récemment nous avons effectué avec Cayrol (1955) des observations analogues sur la noctuelle *gamma* (*Plusia gamma* L.). La polyèdrie à *Borrelina* a été augmentée de 50 p. 100 après alimentation avec feuilles de *Plantago sativa* fanées et jaunâtres. Les plantes coriaces ont un effet semblable par rapport à celles forcées en serre.

Les espèces végétales servant d'aliment aux Insectes polyphages ne semblent pas non plus être sans effets. Pour *Plusia gamma*, l'ingestion prolongée de *Brassica oleracea*, amène rapidement une virose atteignant près de 100 p. 100 alors que pour les autres fractions du lot alimentées avec *Plantago sativa* le taux normal d'état endémique se maintient. Cette action est soulignée par le fait que chaque fois que l'alimentation à *Plantago* est remplacée par celle à *Brassica*, la courbe de virose s'élève.

L'effet alimentaire est plus prononcé chez les Insectes monophages. Nous avons essayé d'évaluer avant toutes les remarques pratiques relatives au Ver à soie et qui sont évidemment nombreuses. En effet, les tentatives d'alimentation avec des succédanés de *Morus alba* ont abouti régulièrement, jusqu'à présent, à un échec ou à des pertes importantes. En recherchant dans les descriptions nous avons trouvé fréquemment la polyèdrie. Quinze éducations alimentées avec quatre succédanés de *Morus alba* ont été suivies pendant trois saisons séricicoles et nous avons pu noter que *Morus nigra* favorise peu la polyèdrie, que *Cudrania triloba* et *Lactuca sativa* la vaforisent davantage et enfin que *Maclura aurantiaca* présente un effet fovarisant très prononcé.

En dehors des effets liés à l'aliment lui-même, mentionnons ceux en rapport avec certaines substances ingérées avec celui-ci. En suivant de près les élevages de Vers à soie dans les départements du Gard, de l'Ardèche et de la Lozère, en 1949, 1950 et 1951, nous avons délimité une région dans laquelle la grasserie apparaît chaque année avec une intensité exceptionnelle. En traçant la carte des élevages particulièrement atteints, une zone de grosses pertes a pu être localisée sur une surface limitée au nord par une usine de produits chimiques. Au nord de l'usine, l'intensité de la virose ne dépasse pas le taux normal de la région et vers le sud, au-delà de 6 km elle diminue progressivement. Cette zone correspond, à qelques différences près, à celle reconnue comme défavorisée au point de vue agricole, par suite des émanations de l'usine. Les différences dans l'intensité d'apparition s'expliquent par la situation de chaque point par rapport à l'usine et en fonction de la direction nord-sud du vent dominant. D'ailleurs les détails de l'effet semblent se modifier d'une saison à l'autre selon les conditions climatiques dominantes. L'affection atteignant les Vers à soie de cette zone est particulière et se manifeste par une irrégularité du développement avec troubles digestifs et vomissements. Si ces effets ne sont pas léthaux (cas habituels) une atrophie légère signale l'état pathologique pouvant se prolonger pendant toute la vie larvaire. Les symptômes deviennent alors semblables à ceux de la grasserie à l'exception de l'excès de turgescence. Les tissus adipeux et sanguins, portent des lésions virales avancées même quand les larves ne présentent apparemment aucun symptôme de grasserie.

Le rôle dans cette affection des substances transportées par l'air a été précisé par deux procédés :

D'une part, trois élevages issus chacun de 5 grammes de graines (Roustan 200-300) et éloignés de la « zone d'émanations » ont été alimentés la moitié avec des feuilles locales et la moitié avec des feuilles récoltées dans la zone en question. Le total de polyèdrie resta inférieur à 2 p. 100 dans la première fraction des trois élevages et dépassa 20 p. 100 dans chacune des deuxièmes fractions.

D'autre part, la moitié d'un autre élevage (5 grammes de graines Roustan 200-300) fut alimenté avec des feuilles provenant de la zone à l'étude, et la deuxième partie, avec les mêmes feuilles mais ayant préalablement été trempées (avec brassage) dans l'eau pendant une heure. Nous avons assisté à l'évolution de la grasserie dans les deux lots totalisant dans le premier 23 p. 100 et dans le second 13 p. 100 seulement.

Ces vérifications, la comparaison de celles-ci avec la localisation des fluoroses du bétail dans la même micro-région et enfin la présence d'un cas semblable lié également à une usine en Italie (Veneroso, 1934) ont attiré notre attention sur l'action du sel sodique du fluor, constituant essentiel de ces émanations.

Notons également quelques observations occasionnelles sur l'augmentation de virose chez *Bombyx mori* à la suite de l'ingestion de feuilles faiblement souillées de cyanures.

D'autres effets se sont dégagés d'influences d'ordre climatique. Nous avons vu dans de nombreux élevages de production de Vers à soie l'apparition massive de la grasserie au moment de la première mue. Il a été assez aisé de retracer la genèse de ces épizooties, l'infection massive des œufs ou des jeunes Vers étant exclues. Dans certains cas l'alimentation en était responsable (voir plus haut). Pour le reste des changements brusques de température et d'humidité ont pu être précisés pour la période suivant immédiatement l'éclosion. Dans les trois cas les plus prononcés (1953, 1954, Laurac (Ardèche), 1953, Saumane (Gard)) l'incubation a été effectuée par les éleveurs eux-mêmes et nous avons noté à la période des éclosions des écarts de température de 10°C et notamment le premier jour du premier âge (transfert dans la pièce d'élevage) une baisse de 25 à 11°C.

Le rôle du facteur température se révèle particulièrement important pendant les crises physiologiques que constituent les mues. Une coutume répandue dans certaines régions sériciccoles nous a donné de nombreuses occasions de suivre ce point de près. Par crainte de trop hâter la mue, certains sériciculteurs arrêtent le chauffage dès que les Vers s'immobilisent. Cette opération effectuée par un temps froid amène une apparition spectaculaire de la polyèdrie.

Enfin, l'humidité excessive a également été reconnue comme res-

ponsable du déclenchement de la grasserie non pas en tant qu'effet direct mais en contribuant à l'établissement d'un état atmosphérique confiné. Un effet net ne s'est observé que dans les cas où cet état persistait sans interruption pendant plusieurs jours.

De l'ensemble de ces observations relatives à divers Lépidoptères, nous avons retenu d'abord que le déclenchement des viroses à *Borrelina* peut avoir lieu même sans qu'aucun rapport direct avec une infection importante précédant l'épizootie puisse être décelé. Ensuite, nous avons noté que les cas de déclenchement ont été consécutifs à des processus primaires non microbiens. C'est la variété de ces effets primaires qui nous a permis de nous orienter vers des types d'essais susceptibles d'approfondir le problème expérimentalement.

ESSAIS DE PROVOCATION DE VIROSE AVEC EXCLUSION D'INFECTIONS PRÉALABLES

L'apparition spontanée de viroses à la suite de l'intervention de divers facteurs primaires a attiré notre attention sur les éléments étiologiques autres que l'infection externe. Cependant dans notre esprit, ces cas ne peuvent nullement avoir d'autre signification que l'orientation. En effet, pour les influences abiotiques mises en opposition avec la genèse de l'infection, la discrimination est basée plutôt sur une supposition que sur une certitude d'absence réelle d'infection. Nous rangeons d'ailleurs dans cette catégorie toutes les observations effectuées dans la nature ou dans les élevages et signalées en bibliographie sur ce sujet. L'absence d'infection externe a toujours été supposée. Cette dernière est peut-être réduite dans certains cas, elle joue un rôle incontrôlé dans d'autres, surtout quand il s'agit de l'évaluation de l'augmentation des viroses dans les élevages successifs ou au cours de la gradation des populations d'Insectes. Or, pratiquement toutes les données sont de ce domaine.

C'est pour cette raison que dans une première série d'essais effectués en 1949 et 1950, nous avons examiné expérimentalement l'effet des facteurs primaires en nous efforçant d'exclure au maximum tout apport externe de virus. Les précautions dont nous nous sommes entourés étaient diverses. Ainsi le local d'expérience (chambre climatisée $22 \pm 0{,}5$°C, $70 \pm 0{,}5$ p. 100 d'humidité relative) a été désinfecté avec du trioxyméthylène gazeux à dose triple de celle reconnue efficace contre les polyèdries. L'opération a été précédée d'un mouillage avec jet (sous pression de 20 kg) des murs et des objets, avec de l'hypochlorite de soude en solution à 2 p. 100. Cette concentration (précisée par des expériences préliminaires) permet un éclatement et une dissolution des corps d'inclusion ainsi que la destruction immédiate des virus libérés. Le traitement a été appliqué non seulement à la pièce d'expérience, mais aussi

à celles traversées pour y parvenir ; dans ces dernières d'ailleurs il a été renouvelé en cours d'élevage afin de renforcer la barrière défensive.

Les feuilles n'ont pas été désinfectées (afin de ne pas apporter un facteur chimique en plus des traitements activateurs) mais elles provenaient d'une plantation située dans une région non séricicole et ont été livrées chaque jour en sacs stérilisés.

Les personnes chargées de l'élevage n'avaient pas de contact avec d'autres éducations.

L'aseptie du matériel biologique a constitué l'un des problèmes majeurs. La désinfection du chorion des œufs de *Bombyx mori* a dû être mise au point spécialement. En effet, les techniques proposées antérieurement (Glaser, 1927 ; Letje, 1939 ; Bergold, 1943 ; Tarasevitch, 1950) pour prophylaxie auraient pu amener à priori un affaiblissement incontrôlé de l'embryon. Un tel facteur, susceptible d'être un élément pour le déclenchement des viroses, était absolument à éviter dans cette expérience. Par des travaux préliminaires nous avons testé l'hydroxyde de potassium (en fonction de la concentration et de la durée du traitement) vis-à-vis de l'inactivation des virus souillant extérieurement le chorion. Pour cela des œufs ont été infectés extérieurement avec des corps d'inclusion de *Borrelina* dont la concentration devait amener chez les jeunes larves (qui mangent à l'éclosion une partie du chorion) une polyèdrie dépassant 50 p. 100 à la fin du deuxième âge. La diminution ou la disparition de cette mortalité ont permis de définir l'efficacité du traitement à l'hydroxyde de potassium appliqué après l'infection. Les doses retenues ont été ensuite examinées au point de vue nocivité vis-à-vis de l'embryon. Grâce à une triple série de tests portant sur la consistance des œufs, le décalage entre le moment du traitement et l'éclosion et la sensibilité pathologique au cours de la vie larvaire (Vago, 1954 b) nous avons défini le trempage des œufs pendant 12 minutes dans une solution de KOH à 1 p. 100 comme actif contre les virus inclus dans les corps d'inclusion et sans effet vis-à-vis de la larve. Ce traitement laisse une marge d'action dans les deux sens surtout quand il est combiné avec le permanganate de potassium (Vago, 1954 a).

Les œufs désinfectés entre la préincubation et l'incubation ont été déposés dans des casiers isolés, car l'ensemble des essais s'est déroulé en élevages individuels.

Dans la pièce installée spécialement pour ces essais les individus ont été répartis selon un schéma topographique compatible avec une évaluation statistique (voir technique).

Partant des observations sur cas spontanés (relatés plus haut) les expériences ont été concentrées sur un facteur alimentaire, une intoxication et un facteur d'ordre climatique.

a) Expérience sur l'effet du *Maclura aurantiaca* NUTT.

L'alimentation avec les feuilles de ce succédané est caractérisée par une prise de nourriture inférieure à celle des témoins nourris avec *Morus alba* var, *rosea*. Le développement pondéral est légèrement diminué et la peau devient progressivement verdâtre. Microscopiquement, l'accu-

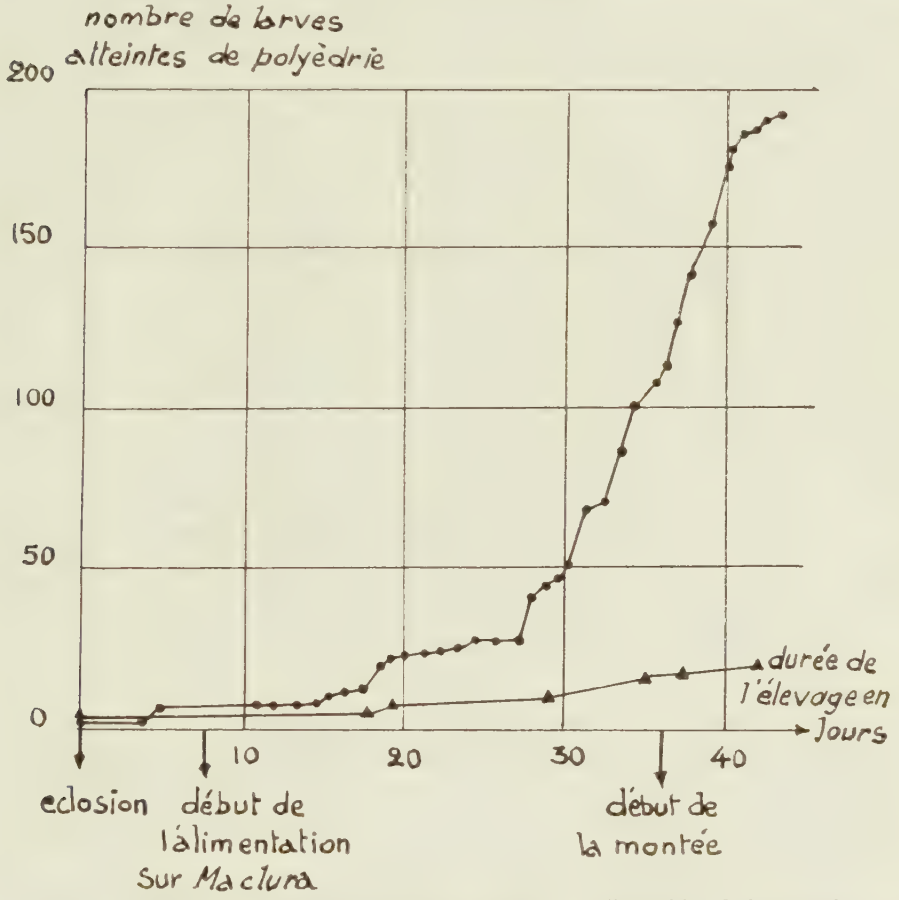


FIG. 38. — Effet du traitement continu au « *Maclura* » sur l'apparition de la grasserie. ● lot traité ; ▲ lot témoin.

mulation d'une substance hyalineuse est à noter dans divers tissus et notamment au contact des trachées. Cette alimentation anormale ne se traduit pas par une mortalité précoce et contrairement à ce qui pouvait être prévu, elle ne provoque pas de dysenterie aiguë.

Au point de vue virose, un taux sensiblement identique se maintient dans les deux lots pendant l'âge suivant le début de l'alimentation au *Maclura* (huitième jour après l'éclosion). A partir du 3^{e} âge, la polyèdrie s'intensifie dans le lot « *Maclura* » et au cours des 4^{e} et 5^{e} âges elle prend

des proportions amenant à la nymphose l'élimination de la presque totalité du lot. Parallèlement, le lot témoin présente un taux inférieur à 20 p. 100 (fig. 38).

D'autres essais (avec protocoles semblables) ont montré que l'évolution de la polyèdrie est d'autant plus faible que l'alimentation au *Maclura* commence à des âges plus avancés. Par contre, si une telle alimentation se produit dès l'éclosion, l'allure de la courbe de virose peut être rapide, avec disparition de la totalité du lot à la 4e mue.

Enfin, l'alimentation au *Maclura* pendant 48 et 192 heures avec continuation sur *Morus alba* ne donne pas la courbe de virose caractéristique et témoigne non pas d'un effet de choc, mais d'une action progressive.

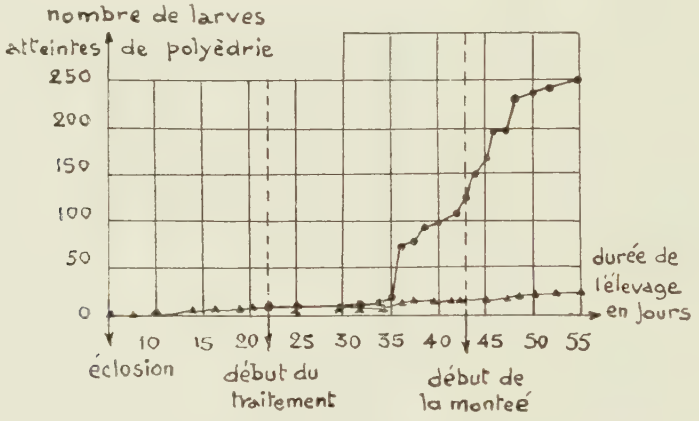


Fig. 39. — Apparition de la polyédrie à la suite du traitement au FNa.
● lot traité ; ▲ lot témoin.

b) Expérience sur l'effet du fluorure de sodium.

D'après les observations concernant l'action des émanations d'une usine de France ainsi que d'après les remarques de Veneroso sur un cas semblable en Italie, nous avons retenu pour nos travaux expérimentaux l'action du sel sodique du fluor (Na F).

Pour pouvoir suivre les effets secondaires de l'intoxication par cette substance il était indispensable d'obtenir une action subléthale. Des essais préliminaires réalisés avec des suspensions à concentration dégressives ont montré que la dose optimum varie non seulement selon les âges, mais aussi selon les conditions d'élevage et les races, ce qui rend la technique très délicate. Pour des essais sur race Roustan-Var, effectués à 18°C et 65 ± 5 p. 100 d'humidité relative avec début de traitement au 3e âge, la concentration de la solution a été fixée à 0,01 %. Les feuilles sont trempées dans cette solution pendant 1/4 d'heure puis légèrement séchées. Pour les Vers alimentés 4 fois par jour, les feuilles traitées sont administrées à deux reprises, soit au premier et troisième repas, et

ceci pour tenir compte du fait que les Vers attaquent plus lentement les feuilles traitées.

Parmi les vingt essais effectués à diverses époques de l'année, peu différents au point de vue allure de la courbe de virose, nous en détaillerons trois examinés parallèlement au cours d'une même saison séricicole avec feuilles de très bonne qualité (avril-mai).

La figure 39 montre les différences particulièrement significatives apparaissant d'une façon uniforme entre les lots traités et les lots témoins au sujet des valeurs totales des viroses.

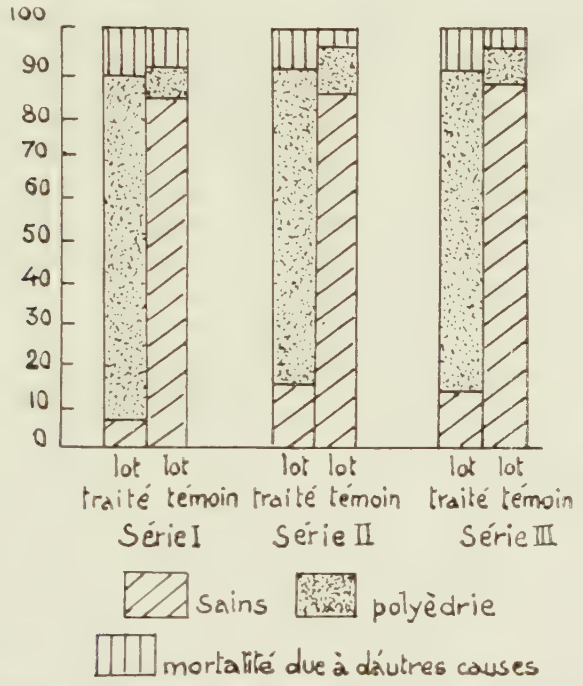


Fig. 40. — Différence de pourcentage de la polyèdrie entre lots traités FNa et leurs témoins.

L'évolution de l'effet secondaire en fonction du moment de traitement et de la concentration de la solution a également été observée. La figure 40 donne les courbes de virose dans deux lots de 300 larves dont l'un a été traité avec Na F à 0,01 p. 100. Le traitement n'a pas d'effets immédiats et la virose ne devient importante qu'au-delà de 12 jours. A partir de ce moment, les cas sont subitement nombreux et la courbe signale rapidement la perte presque totale du lot. Il est difficile d'augmenter ou d'accélérer cet effet car aussi bien l'augmentation de la concentration de Na F à une même température que l'élévation de température en maintenant la même concentration du fluorure transforment l'intoxication morbide en un effet léthal direct.

c) Expérience sur l'effet du refroidissement temporaire.

Ainsi que nous l'avions vu au cours des observations, les variations de température et leurs valeurs extrêmes se sont révélées être des facteurs de déclenchement. Nous avons retenu l'action d'un refroidissement qui a pu être effectué à + 4°C et prolongé pendant plusieurs jours, grâce à la résistance physiologique assez poussée des Vers vis-à-vis d'un tel traitement. L'apparition secondaire de la virose consécutive à un refroidissement étant habituellement 3 à 4 fois plus intense lorsque l'effet primaire se produit pendant les mues, nous avons choisi cette période de la vie des larves pour la réalisation des déclenchements expérimentaux. L'essai réalisé à 4°C a donc débuté à la fin d'un âge, le jour où les larves cessent de manger et a duré 72 heures. Ensuite les larves ont été remises dans des conditions normales. Les meilleurs effets sont obtenus lorsque le traitement a lieu au cours de la première ou de la deuxième mue. Au bout de 4 jours à 22°C, les lésions intra-nucélaires sont déjà fréquentes et quelques jours plus tard (souvent à l'occasion d'une prochaine mue) une courbe progressivement ascendante de mortalité en polyèdrie se dessine. L'allure de la courbe est comparable à celle constatée avec les moyens de déclenchement relatés plus haut.

***

Grâce à l'ensemble de ces expériences, illustrées par trois types différents, une discrimination a été obtenue entre l'effet vis-à-vis du déclenchement de virose aiguë, d'une affection virale et de facteurs physiopathologiques non infectieux.

Il apparaît qu'il est possible de déclencher une virose aiguë non seulement sans infection expérimentale préalable, mais également en l'absence contrôlée d'apport externe de virus.

Les moyens, permettant l'obtention d'un tel effet, sont de natures variées et les facteurs responsables peuvent être liés à l'alimentation, à des intoxications par certaines substances chimiques, ainsi qu'aux conditions climato-physiologiques.

Ces expériences établissent ainsi une distinction permettant de considérer certains facteurs physiopathologiques primaires comme effectivement responsables du déclenchement des viroses, notion sans laquelle une discussion sur le problème des « viroses sans infection » nous paraît impossible (les données bibliographiques actuelles sur cette question sont d'ordre écologique).

VARIATIONS DE RÉCEPTIVITÉ

Après la discrimination entre l'effet de l'infection et celui des facteurs capables de déclencher la virose, le point expérimental le plus important nous a semblé être la définition de l'existence ou de l'absence de

réponses semblables chez les souches de *Bombyx* appartenant à des races variées et de provenances diverses. Cette décision nous a paru indispensable pour l'interprétation du mécanisme du déclenchement.

Dans ce but nous nous sommes procurés des souches de races pures et de races industrielles provenant non seulement de lignées et de sélections différentes, mais également de divers pays d'Europe, du Moyen-Orient et d'Asie (1). Voici les races utilisées pour ces essais échelonnés sur trois années :

A. — *Races pures.*

1° Souches de Laboratoire :

a) Delmas soufrés : France.
b) Delmas uni-polylunulaires : France.
c) Téhéran blanc : Iran.
d) Szeszard 7 : Hongrie.

2° Types industriels.

a) Roustan Alpes Jaunes 200-300 : France.
b) Agniel indigènes jaunes : France.
c) Bagdad : France.
d) Jaunes Bulgares : Bulgarie.
e) Jaunes indigènes : Hongrie.
f) Jaunes indigènes : Yougoslavie.
g) Ascoli 1 : Italie.

B. — *Croisements industriels.*

a) Bi-jaunes Roustan (♂ chinois doré × ♀ Alpes jaunes) : France.
b) Fo (Katakura) : Japon.
c) Choan × Taikei : Japon.

Les techniques précisées plus haut pour les essais de discrimination sont valables également pour ces expériences. Le déclenchement de la virose a été assuré par les moyens préalablement étudiés notamment avec alimentation au *Maclura*, intoxication au fluorure et effet du refroidissement. La multiplication des essais a paru en effet indispensable pour diminuer les erreurs pouvant provenir d'une éventuelle accoutumance naturelle à certaines des conditions. Rappelons qu'en raison de la diversité des races nous avons rencontré certaines difficultés pour déterminer la concentration de fluorure de sodium amenant un effet chronique sans atteindre un degré léthal.

Sans nous étendre sur les différences de détails entre les actions en fonction des souches (car elles n'ont pas de signification pour l'évaluation des courbes de viroses) précisons d'abord que dans chaque lot et pour chacun des traitements, une augmentation des cas de virose s'est produite par rapports au lot témoin.

(1) L'obtention d'une partie de ces souches nous a été facilitée par la Commission Séricicole Internationale.

La maladie aiguë totalise dans les lots témoins 0,5 à 11 p. 100 et dans les lots traités elle est comprise entre 22 et 80 p. 100. L'allure des courbes montre également de fortes variations de la vitesse de déclenchement sans pouvoir toutefois signaler une race particulièrement insensible. Par contre, des allures très rapides de virose ont été notées, quel que soit le traitement utilisé chez les trois souches de races pures, type industriel.

Pour la souche A (1), élévation de la polyèdrie de 3 p. 100 à 75 p. 100 en 7 jours ; pour B (1) de 3 p. 100 à 88 p. 100 en 6 jours et pour C (1) de 2 p. 100 à 87 p. 100 en 4 jours.

Ces essais comparatifs permettent de dégager notamment :

— la possibilité de déclenchement de virose sans infection externe pour toutes les souches de Vers à soie examinées et échantillonnées à l'échelle mondiale parmi les races employées pour la sériciculture ou maintenues en collections.

— une variation dans l'intensité de réponse des diverses souches vis-à-vis des traitements.

***

La constatation de la possibilité généralisée de déclenchement de virose chez les races courantes de *Bombyx mori* n'a été cependant considérée que comme une étape. Nos observations antérieures sur la non apparition de viroses dans certaines lignées de *Galleria* pendant de nombreuses générations (voir « observations ») nous ont suggéré de rechercher systématiquement des lignées exceptionnelles de Vers à soie dans lesquelles tout déclenchement de virose soit impossible. A cet effet, nous avons retenu d'abord les souches caractérisées par une faible réaction au cours des essais comparatifs relatés plus haut. Les œufs d'origine ont été mis en élevage après désinfection de leurs chorions par un traitement viricide (voir « techniques »). Les générations successives ont été maintenues avec grands espacements des larves (6 m^2 de surface pour larves du 5^e âge issues de 1 gramme de graines), aération forcée (renouvellement de l'air neuf fois par heure) et inspection 4 fois par jour avec élimination des individus d'aspect anormal.

Il nous a ainsi été possible d'annuler pratiquement toute recontamination par contacts et de réduire au minimum un déclenchement de virose dû à des conditions d'élevage. Le grainage a toujours été cellulaire et a comporté à chaque génération la désinfection des chorions.

Le maintien des lignées parallèles a eu des conséquences variables selon les lots. Au bout de trois génératon, dans certaines lignées de la race Roustan 200-300, le niveau de virose est tombé à 0,01 p. 100. Le test *Maclura* l'a fait monter à 21 p. 100.

(1) Désignations adoptées pour des raisons inhérentes à l'Industrie séricicole.

Par contre, dans d'autres lignées de la même race, surveillées de très près pour d'autres raisons au point de vue grasserie depuis quatre générations, nous n'avons pas pu obtenir dans des conditions normales d'élevage et à la troisième génération de notre expérience des larves atteintes de virose.

Dans ces lots les traitements de déclenchement (consistant en l'alimentation au *Maclura* ou en un refroidissement pendant la deuxième mue) ont augmenté légèrement les taux de virose respectivement jusqu'à 3 et 4 p. 100. Nous retenons aussi deux lignées élevées en Cévennes ardéchoises (par un sériciculteur choisi) et issues de graines fournies et reproduites par nous-même après chaque élevage. Dans ces lots de 3 000 Vers environ, il n'a pas été possible en 1954 de mettre la polyédrie en évidence, même après un traitement de déclenchement effectué selon les deux techniques qui viennent d'être mentionnées.

Cette deuxième série d'études complète la première en précisant que :

— la possibilité de déclenchement de la polyédrie, par des facteurs agissant sur la physiologie de l'Insecte, peut présenter des exceptions, bien que le phénomène soit généralisé sur l'ensemble des races sérici-coles ;

— une telle indifférence vis-à-vis des moyens de déclenchement ne se produit chez *Bombyx mori* que dans le cas de lignées spécialement suivies ;

— par des recherches systématiques, il est possible de déceler des souches moins sensibles que la majorité.

Des recherches plus significatives et plus poussées ont été effectuées sur d'autres Lépidoptères (*Galleria mellonella* L., *Tineola bisselliella* Hum., *Ephestia kuhniella* Zell.) chez lesquels la sélection des souches est plus rapide (fréquence des générations) et l'élevage aseptique plus aisé que chez *B. mori*. Les résultats obtenus confirment les phénomènes relatés ci-dessus et les mettent en évidence d'une façon plus marquée. La partie expérimentale du présent travail étant limitée à *B. mori* ces études seront détaillées ultérieurement.

FACTEURS DE NON APPARITION

Les essais sur le rôle des facteurs non infectieux dans le déclenchement des viroses ont fait ressortir un fait positif : l'apparition de la maladie aiguë.

Parallèlement, nous avons cru pouvoir avancer dans la compréhension du mécanisme de déclenchement en étudiant ces mêmes phénomènes dans leur sens négatif, c'est-à-dire en définissant l'état caractérisé par l'absence du déclenchement de virose.

L'obtention d'un tel état sous-entend des difficultés particulières consistant en l'existence de témoins valables ne présentant aucune manifestation de la polyédrie. Ainsi, un certain nombre de facteurs de déclenchement semble être présent d'une façon normale et spontanée. D'ailleurs sur ce point nous ne devons pas ignorer les avis des sériciculteurs anciens conseillant, pour diminuer les dégâts en grasserie, de modifier les conditions climatologiques ou alimentaires de l'éducation (Boissie de Sauvages, 1788 ; Bolle, 1913).

Les effets de plusieurs facteurs, considérés comme susceptibles d'agir au cours des élevages, ont donc été analysés expérimentalement et successivement. Ces travaux ont consisté en la réalisation progressive des valeurs optima de chacune des conditions déterminant le déroulement d'une éducation. Grâce à une chambre conditionnée à réglages multiples (voir « techniques ») et à un personnel adapté à ces tâches, il a été réalisé une série d'élevages (race Roustan 200-300) ne présentant que 0,01, 0,1, 0,05, 0,01, 0,03, 0,01 p. 100 de polyèdries pour des populations issues de 5 grammes de graines désinfectées. Parallèlement, dans six autres lots d'égale importance et élevés dans des conditions normales d'élevage, les proportions ont été de 2,5, 4,1, 4,0, 3,2, 1,9, et 2,0 p. 100.

Par la correction progressive des facteurs, les faits négatifs suivants ont été retenus comme déterminant une non-apparition de la virose par absence :

— de variation brusque de température et d'humidité,

— d'un état hygrométrique élevé et persistant (au-dessus de 90 p. 100),

— d'un état hygrométrique élevé et persistant (au-dessus de 90 p. 100),

— de température élevée (+ 30°C) ou basse (+ 14°C),

— d'atmosphère confinée et de condensation d'eau,

— de troubles digestifs (soit alimentaires, soit bactériens, soit respiratoires),

— de feuilles de mûrier très développées, comme aliment pendant les premier et deuxième âges,

— de feuilles de mûrier très jeunes et aqueuses comme aliment pendant les quatrième et cinquième âges,

— de feuilles de succédanés comme aliment,

— de rayons solaires directs,

— d'intoxication,

De l'ensemble de ces facteurs négatifs se dégagent deux notions.

D'abord la multitude et la variété des facteurs dont on doit tenir compte pour réduire le déclenchement de la virose dans une population sensible.

Ensuite, la correspondance de l'ensemble des conditions de la

« non apparition » avec un état physiologique optimum exempt de tout dérangement d'ordre pathologique ou parapathologique.

Ces deux considérations traduisent les facteurs de déclenchement de virose comme étant des troubles physiologiques qui, malgré la nature variée des effets externes peuvent, converger vers un mécanisme précis à l'échelle cellulaire.

ASPECTS HISTOPATHOLOGIQUES

La nature des liens entre les processus primaires et l'apparition secondaire des viroses a été recherchée également par l'étude des altérations cellulaires et tissulaires.

Ces travaux ont été d'abord effectués sur des larves (3^{e}, 4^{e} âges) ayant déjà subi l'effet du déclenchement. Les lésions dominantes, mises en évidence sur coupes avec colorations au bleu Victoria, à l'hémalun-érythrosine et à l'hématoxyline ferrique, consistent invariablement en l'hypertrophie nucléaire des tissus adipeux, épidermiques et péritrachéaux avec fusion des taches chromatiniennes et formation de corps polyédriques intra-nucléaires. Ces lésions, caractéristiques de l'action des *Borrelina*, se retrouvent d'une façon uniforme quelle que soit la nature de la première phase ayant amené le déclenchement.

D'autres lésions, moins constantes, caractérisent chacune des phases primaires. Ainsi, après l'alimentation au *Maclura aurantiaca* et après l'action du fluorure de sodium, on constate respectivement d'une part l'infiltration d'une substance hyalineuse, d'autre part une atrophie du tissu adipeux avec relâchement de l'épithélium méso-intestinal. De même, consécutivement aux dérangements respiratoires, une vacuolisation du cytoplasme des micro-nucléocytes est à noter.

L'état histopathologique pendant les traitements de déclenchement consiste en l'apparition des lésions du processus primaire. Ensuite, et au plus tôt 48 heures après ce dernier, l'hypertrophie nucléaire devient fréquente dans les hémocytes et les lésions virales évoluent progressivement.

Ayant remarqué dans certains cas la précocité des anomalies dans la répartition de la chromatine nucléaire, l'examen systématique des Vers avant le déclenchement de la virose a été envisagé. Ceci qui est à première vue paradoxal, revenait en effet à rechercher la virose dans les individus apparemment sains. Cependant, la possibilité de déclenchement de cette affection dans tous les lots de Vers à soie nous a suggéré de réaliser un tel travail lequel s'est effectué d'ailleurs périodiquement pendant cinq ans. Il a porté sur 4 220 examens relatifs à 2 808 larves de races énoncées plus haut et a permis de faire trois constatations.

D'abord la fréquence avec laquelle les larves sans symptômes pathologiques apparents contiennent dans certaines cellules sanguines et péri-

trachéales, des corps d'inclusion de virus. De telles cellules sont rares et une vue d'ensemble sur un tissu ne permet pas de les remarquer. C'est grâce à des examens en série de « frottis épais », de culots de centri-

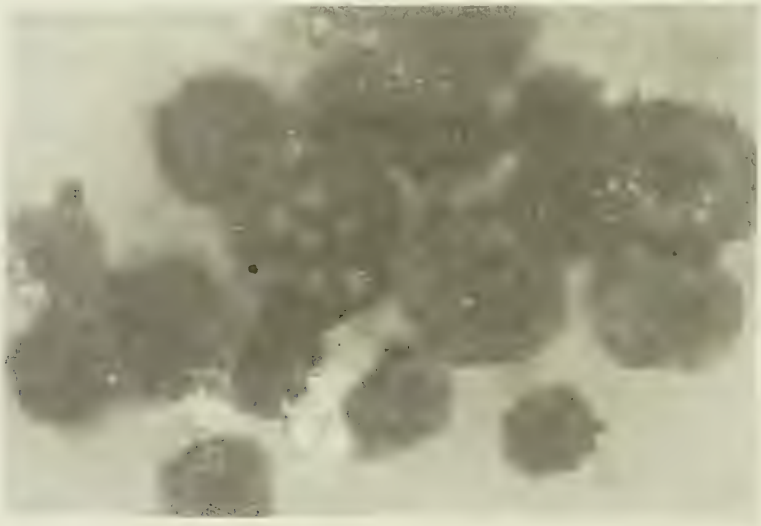


Fig. 41. — Hémocytes avec altérations virales réduites, chez la larve de *B. mori* (3e âge) cliniquement saine et restée saine pendant toute la vie larvaire. Pappenheim 1 : 1000.

Fig. 42. — Structure de corps d'inclusions intranucléaires provenant d'hémocytes de larves de *B. mori* (4e âge) cliniquement saines. Microscope à lumière. Prep. Teepol — Nigrosine 1 : 2 000.

fugation d'hémolymphe ou de coupes en rubans ininterrompus (colorées à l'hématoxyline ferrique) qu'elles ont pu être décelées. Il s'agit souvent de polyèdres prenant le bleu de méthylène alcalin non seulement sur leurs contours, mais aussi intérieurement.

L'un des point essentiels était d'acquérir la certitude de l'origine virale de ces corps, car malgré la ressemblance morphologique de ceux-ci avec les polyèdres et malgré des propriétés tinctoriales comparables, leurs conditions d'apparition pouvaient être considérées comme anormales. Ces corps, après centrifugation de l'hémolymphe (4 000 t/m pendant 1 minute) ont été traités pendant 21 heures (avec l'ensemble du culot composé de cellules) avec une substance tensioactive (Teepol) en solution à 0,1 p. 100. Colorés d'une façon négative à la nigrosine aqueuse à 1 p. 100 ces polyèdres montrent la structure caractéristique (obtenue par cette méthode) des corps d'inclusion de *Borrelina bombycis* (fig. 42).

Ensuite, mentionnons que dans des larves saines, certaines cellules des tissus déjà signalés ont des noyaux hypertrophiés tandis que d'autres les entourant ne présentent pas cette anomalie. La répartition de la chromatine de ces noyaux sous forme de taches nous amène à rapprocher l'ensemble de ces altérations de celles caractérisant le début de pathogènèse d'une polyédrie (fig. 41). De tels symptômes ont été identifiés nettement sur 18 p. 100 des larves examinées et plus difficilement chez 20 p. 100 d'autres individus. La certitude de l'action virale a été obtenue grâce à l'examen au microscope électronique de coupes ultrafines de tels noyaux (voir « techniques »). Malgré l'absence de polyèdres opaques, des corps élémentaires de virus à formes et dimensions caractéristiques (Vago, Croissant, Lépine, 1955) se retrouvent dans le suc nucléaire en contact avec la chromatine.

Enfin, retenons une précision complémentaire concernant le dynamisme de ces lésions. En maintenant dans des conditions optima des larves saines chez lesquelles une prise d'hémolymphe effectuée au troisième âge a révélé l'hypertrophie du noyau de quelque micro et macronucléocytes et la présence de quelques corps polyèdriques intra-nucléaires, il a souvent été impossible de constater une extériorisation de la virose non seulement au cinquième âge, mais aussi au cours de l'état nymphal ou imaginal. Les examens hématologiques effectués à la fin du cinquième âge sur les mêmes larves ont révélé la persistance de ces lésions avec un nombre légèrement plus élevé de noyaux anormaux.

Ainsi l'ensemble des examens histopathologiques montre d'une part que les liens entre les processus primaires et la virose déclenchée ne se traduisent pas par des lésions de transition. D'autre part, il attire l'attention sur l'existence de viroses très réduites même chez certains Vers cliniquement sains et sur la possibilité de persistance d'un tel état d'infection pendant toute la vie de l'Insecte sans qu'apparaisse une maladie aiguë.

TENTATIVES D'EXPLICATION DE LA PATHOGÉNÈSE PHENOMÈNES DE LATENCE

Dès que nous avons eu à notre disposition un certain nombre de renseignements provenant, soit d'observations, soit de données écologiques signalées sur la fluctuation des viroses chez divers Lépidoptères, ne présentant pas d'infection apparente (1948), nous avons essayé avant tout d'établir une discrimination entre le facteur infectieux et les facteurs indépendants d'un apport de virus. En effet, les observations au sujet du délenchement des viroses présument, à priori, l'absence de toute infection aussi bien dans la nature que dans les élevages massifs et successifs. L'étude expérimentale du problème de déclenchement des viroses sans infection n'a pu être entreprise que lorsqu'on a eu le maximum de certitudes quant à l'exclusion du facteur infectieux. Aussi avons-nous évalué les données réunies à cette époque d'après nos observations personnelles ou d'après la bibliographie entomologique comme étant des indications écologiques. C'est en réalisant la discrimination expérimentale que les courbes de déclenchement de virose ont pu être interprétées en fonction des seuls facteurs non infectieux.

Le point de convergence des divers aspects fut consitué ensuite par la nature des éléments amenant le déclenchement. D'après les expériences il ne peut pas s'agir d'une simple accélération du développement des virus due à des effets physico-chimiques généraux comme par exemple l'augmentation de la température ambiante. Une action favorisante directe comparable à celle de l'hygrométrie élevée vis-à-vis de la germinaison des cryptogames entomophytes ne peut pas non plus être envisagée.

Au contraire, tous les cas spontanés et expérimentaux de déclenchement de polyèdrie commencent par des processus constituant en eux-mêmes un état pathologique. Ainsi, l'action du fluorure de sodium vis-à-vis des Insectes en général et des Lépidoptères en particulier est connue. De même la « maladie au *Maclura* » chez le Ver à soie est un état caractéristique. Les troubles intestinaux et métaboliques, consécutifs à une alimentation anormale, sont aussi des syndromes pathologiques très marqués chez les Lépidoptères monophages et moins proconcés chez les Lépidoptères polyphages. Enfin, les conséquences directes des asphyxies partielles constituent des entités même si elles n'aboutissent pas à une virose.

Donc, le déclenchement des viroses par des facteurs non infectieux nous apparait sous forme *d'un complexe constitué d'une partie primaire englobant des processus pathologiques divers et d'une partie secondaire représentée par la virose.*

Rechercher les liens entre ces deux processus successifs revenait

à traiter sur un cas particulier, le problème (posé en virologie comparée) du mécanisme de la formation des viroses sans infection.

Les actions susceptibles de déclencher expérimentalement une virose n'ont pas pu être ramenées pour tous les types de facteurs à une pathogénèse unique. L'hypertrophie cytoplasmique ou nucléaire, la vacuolisation et le changement de basophilie ou d'éosinophilie des fractions nucléaires ou protoplasmiques, l'hyper ou l'hypo-leucocytose, la modification de la composition protéinique de l'hémolymphe, l'hyper ou l'hypo-sécrétion sont présents dans certains cas et absents dans d'autres. D'un autre côté, les dérangements respiratoires inhérents au micro-climat, l'action des cyanures vis-à-vis des processus de respiration, ou du fluorure de sodium sur l'énolase et indirectement sur les processus de phosphorylation, enfin l'excès protéinique de l'aliment au détriment d'autres composants convergent vers le mécanisme des troubles métaboliques. Ces détails d'ordre biochimique transposent le problème pathologique sur le plan de l'enzymologie cellulaire. Bien qu'il soit possible d'interpréter certains points de l'action cellulaire des mécanismes qui viennent d'être signalés à la lumière des connaissances actuelles sur les processus métaboliques, il nous semble difficile d'attribuer en ce moment le mécanisme de l'apparition des virus à une réaction d'autocalatyse chimiquement précise et ceci sans avoir recours à un élément préexistant (Yamafuji, Cho, 1947 *a* ; Yamafuji, Yuki, 1947). Il ne nous paraît pas possible non plus de donner autre chose que des hypothèses au sujet des réactions chimiques entre un dérangement métabolique et l'apparition des virus intracellulaires. On touche ici au problème de l'intégration des virus dans la structure macro-moléculaire du plasma. Certains de nos résultats expérimentaux semblent cependant en rapport étroit avec le mécanisme de cette intégration. Ont été pris en considération :

— l'existence de lignées dans lesquelles les viroses apparaissent peu ou pas du tout, alors que chez d'autres une endémie s'installe facilement,

— la non apparition de viroses dans certains cas malgré les traitements de déclenchement (plus prononcée chez certains Lépidoptères que chez d'autres).

— le déclenchement par un même type de traitement, de polyédrie de type intra-nucléaire (*Borrelina*) à corps d'inclusion membraneux et virus bacilliformes en faisceaux, de polyèdrie (*Smithia*) à corps d'inclusion non membraneux contenant des virus cocciformes ou de granuloses à corps d'inclusion individuels (*Bergoldia*).

— enfin, l'obtention par le déclenchement, de lésions caractéristiques, entièrement identiques à celles propres à des virus contagieux et spécifiques.

Ces faits semblent peu compatibles avec la formation artificielle du

virus basée uniquement sur une réaction de transformation des protéines. (Conception en 1950, Acqua, Yamafuji, Veneroso, Schvetzova, etc...) Ils nous ont fait entrevoir la présence nécessaire d'un élément portant la potentialité du virus, et ayant des caractères, une action, et une extériorisation définis. Ils nous ont fait prévoir lors de l'exposé (1951 *b*) des résumés de ces travaux successifs, la préexistence sous forme inactive ou peu active du virus comme la condition « sine qua non » du complexe (*Latence*).

Les faits expérimentaux qui viennent d'être exposés ont été précisés lors d'échanges de vues en pathologie comparée. Luria écrit (1953) dans son traité de virologie générale : « On a prétendu que le virus est produit par une transformation des gènes de l'hôte en une protéine virale. Il paraît plus raisonnable de supposer que les substances chimiques utilisées sont susceptibles d'induire la maturation de l'action pathogène d'un virus latent (provirus) ». Haudurov (1954, Symposium des « problèmes actuels de virologie ») considère ces faits comme « exemples parfaits » de « virus endormi » et de « réveil » et croit plus vraisemblable cette conception que celle de production des virus. Bergold (1953) dans sa mise au point sur les virus d'Insectes désigne les phénomènes d'autocatalyse des auteurs japonais comme étant la provocation de maladie latente. Oberling (1952) en analysant la théorie virale du cancer retient nos expériences sur la latence des virus et souligne l'intrêt comparatif de l'extension d'un état latent sur une souche ou une population.

Récemment, dans le domaine de la virologie des Insectes, Krieg (1955 a) effectuant des essais de déclenchement chez *Neodiprion sertifer* (Geoffr.) avec des substances proposées par yamafuji et par nous-même, croit pouvoir interpréter les résultats comme étant ceux d'une infection latente. L'indifférence d'une souche de *Bombyx mori* à ces traitements chimiques l'amène à des conclusions semblables (1955 *b*). Dans une note de discussion (1956) ce même auteur désapprouve la théorie de formation endogène des virus aussi bien dans le sens de Yamafuji ou de Schvetzova (1950) que dans celui de Jermolajev (1953) et il se rattache à l'interprétation par la latence. Récemment, d'ailleurs Yamafuji lui-même (1955 *a*, 1955 *b*) et ses collaborateurs ont supposé que des éléments préexistants joueraient un certain rôle dans le déclenchement chimique des viroses.

Les observations écologiques en rapport avec la gradation des populations d'Insectes, supposent la préexistence de germes latents sans en rechercher toutefois les origines pathologiques (Grison, Vago, 1953 ; Kovacevic, Schmidt, 1956).

Peu à peu le phénomène de la latence et l'activation des viroses chez les Insectes semblent s'intégrer dans certaines préoccupations actuelles très discutées en pathologie. Ainsi, les faits expérimentaux

exposés montrent un certain parallélisme avec la lysogénie des souches bactériennes et les travaux en cours tendent à évaluer les points de correspondance comme la phase prophage, l'activation par le rayonnement ultra-violet et la période aiguë de la lyse (Lwoff, Siminovitch, Kjeldgaard, 1950 ; Lwoff, 1952, 1953 ; Wollman, 1953).

Il en est de même pour les phénomènes traités par l'Héritier (1937, 1946, 1947, 1949, 1950, 1954), Teissier (1937), Plus (1950, 1954, 1955), Brun (1955), Sigot (1946, 1955), Hugon De Scoeux (1947, Guillemain (1953), au sujet de la sensibilisation au CO_2, transmissible par inoculation chez *Drosophila melanogaster*. D'ailleurs, L'Héritier (1955) mentionne le déclenchement des viroses chez les Lépidoptères à titre d'analogie avec comme lien un élément latent spécifique.

De l'ensemble des phénomènes convergent vers le mécanisme recherché fait partie également la persistance sans action marquée des virus « portés » des végétaux (Smith, 1933, 1952 ; Limasset, Cornuet, Martin, 1951) ; il en est de même pour certains virus de Vertébrés qui ont besoin d'un affaiblissement de l'hôte pour que la virose devienne évidente (Rivers, Trillet, 1924 ; Andrewes, 1928 ; Lépine, 1943, Sautter, 1945). La comparaison de tous ces phénomènes ne peut cependant pas à l'heure actuelle être basée sur une connaissance du mécanisme intime. Nous croyons d'autre part, que c'est précisément par la confrontation permanente de nouveaux renseignements, obtenus dans chacun de ces types, que la réaction chimique intracellulaire du déclenchement des viroses pourra être éclaircie d'une façon précise.

Nous retenons à cet égard et en nous basant sur les expériences précédemment relatées, la tolérance d'un organisme vis-à-vis d'un virus avec une certaine inhibition simultanée, signes caractéristiques d'un microorganisme en voie d'adaptation à une neutralité symbiotique même temporaire (Vago, 1952 *b*). Rappelons à cet effet un aspect particulier, décelé par l'histopathologie (Vago, 1955 *a*) et consistant en la possibilité de persistance prolongée des viroses à polyèdres, non seulement en état inactif, mais également à un degré très réduit (limité à de rares lésions) de la phase dynamique.

CONCLUSIONS

Partant du fait de la dépendance (remarquée depuis longtemps par les écologistes)inhabituelle des viroses d'Insectes par rapport aux conditions climatiques, alimentaires ou à d'autres influences abiotiques, des types expérimentaux d'effets primaires suivis du déclenchement de la virose ont été définis.

Une première série d'expériences a établi une discrimination entre

l'étiologie par l'infection directe et celle due à des facteurs non infectieux en l'absence contrôlée d'apport externe de virus. Différentes influences, dont l'ingestion de doses subléthales de fluorure de sodium, une alimentation anormale avec feuilles de *Maclura aurantiaca* et un refroidissement prolongé, apparurent susceptibles d'amener, par une action chronique, des polyèdries importantes.

Chacun de ces processus détermine une action pathologique connue, même sans conséquences virolcogiques. L'ensemble du phénomène se traduit ainsi par un complexe dont la première phase consiste en des affections d'origines diverses amenant des troubles métaboliques et dont la seconde partie est constituée par l'apparition des viroses sous leurs formes classiques.

La comparaison du déclenchement expérimental sur un grand nombre de lignée de *Bombyx mori* provenant de divers pays européens et asiatiques ainsi que chez d'autres Lépidoptères, montre que la réalisation des complexes dépend dans une certaine mesure dun facteur intrinsèque généralisé, mais non obligatoire dans le cas Ver à Soie et souvent absent dans certaines lignées d'autres espèces. Il a été montré ensuite la présence courante dans des conditions naturelles habituelles d'un déclenchement spontané de virose. Par méthode éliminatoire nous avons obtenu un état à taux très réduit de virose. Celui-ci correspond à l'absence de certains troubles physiologiques. Des faits renforcent avec preuves « négatives » le rapprochement de l'action des facteurs non infectieux, des troubles métaboliques à l'échelle cellulaire.

A l'histopathologie, nous avons pu suivre la progression du processus de déclenchement et la transition amenant à des lésions virales. Enfin, grâce à des techniques particulières la présence des lésions virales très réduites, a été définie chez des Vers cliniquement sains avec possibilité de persistance d'un tel état toute leur vie.

Les caractéristiques obtenues par ces expériences ainsi que celles retenues chez des viroses et Lépidoptères divers, nous ont amené à considérer, dans l'établissement du complexe, un élément préexistant portant la potentialité spécifique d'un virus (1951 b). Nous ne pourrons pas expliquer l'enchaînement par la « formation artificielle » du virus comme ceci a été envisagé lors de l'apparition de certains cas de viroses d'Insectes.

A l'heure actuelle ces constatations sont fréquemment citées en rapport avec les travaux sur la genèse de l'action virale, problème très discuté en pathologie comparée.

Mises en opposition avec la théorie de la formation artificielle des virus d'Insectes, elles sont considérées comme les seules compatibles avec les données actuelles connues en virologie.

Grâce à des analogies avec la tolérance symbiotique et à l'activation

par des troubles métaboliques, le complexe étudié se range parmi les phénomènes posant le problème des virus non extériorisés, comme la lysogénie des souches bactériennes (prophage), la sensibilité au CO_2 transmissible chez la Drosophile ainsi que les virus « endormis » des végétaux ou des animaux supérieurs. Enfin, le mécanisme du lien du complexe a également été pris en considération dans l'étude de certains problèmes cancérologiques.

Le complexe étudié semble s'établir couramment chez les populations d'Insectes dans la nature. Les rapports entomologiques les plus directs de son mécanisme portent sur la dépendance de l'état d'infection des populations des conditions alimentaires et climatiques, sur les conséquences tardives (évolution vers une virose) de certains traitements chimiques et sur l'étiologie du dynamisme des populations. Ces questions sont du ressort de l'écologie.

Dans le cas des Insectes utiles et pour l'une des maladies importantes en Sériciculture : « la grasserie », l'étude du complexe se traduit par des conséquences pratiques portant sur la définition et l'élimination des facteurs d'activation (courants dans les éducations) et sur la recherche et la sélection de lignées à taux de déclenchement très réduit. Ce sont là deux voies tendant à réduire les pertes constantes en élevage, de l'ordre de 1 à 8 p. 100 enregistrées dans tous les pays sériciculteurs.

Chapitre VIII

CONSIDÉRATIONS ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

I. — FACTEURS D'INTERACTIONS PATHOLOGIQUES

Nous venons de suivre expérimentalement sur *Bombyx mori* L. quelques cas typiques de complexes de maladies, afin de voir comment, entre plusieurs affections, peuvent s'établir des rapports d'enchaînement. Ces cas ont été choisis parmi d'autres observés sur divers Insectes, comme les Lépidoptères *Lymantria dispar* L., *Vanessa urticae* L., *Saturnia pyri* L., *Artia caja* L., *Pieris brassicae* L., *Galleria mellonella* L., *Tineola biselliella* Hum., *Ephestia kühniella* Zell., *Hyponomeuta padella* L., *Spilosoma* sp., *Sesamia cretica* Led., *Sesamia nonagrioïdes* Lef., *Thaumetopoea pityocampa* Schiff., *Deilephila euphorbiae* L. et *Gnorimoschema operculella* Zell., les Coléoptères *Melolontha melolontha* L., *Cetonia aurata* L., *Tenebrio molitor* L., *Dermestes lardarius* L., et *Rhizotrogus solstitialis* L., les Orthoptères *Gryllulus domesticus* L., *Blabera fusca* L., *Blatta orientalis* L., l'Hyménoptère *Apis mellifica* L., les Diptères *Calliphora vomi-*

toria L., *Drosophila melanogaster* MEIG., *Ceratitis capitata* WIED et *Tipula* sp. (1).

La nature des liens entre les affections s'est révélée comme étant très variée. Non seulement, les modalités du mécanisme de la pathogénèse différent, mais la gamme des affections primaires est très étendue.

Nous avons pu retenir certains éléments paraissant déterminants pour l'établissement des rapports d'enchaînements. Ces éléments ont été groupés en catégories selon leur action et leur origine. Ainsi, la plupart est liée directement au processus de la pathogénèse et aux lésions par lesquelles ils s'extériorisent. D'autres découlent plutôt des propriétés biologiques ou parasitaires de souches microbiennes. Souvent, les motifs physiologiques intrinsèques du développement normal interviennent. Enfin, des rapports étroits avec les facteurs écologiques ont été reconnus.

Analysons comparativement l'importance des facteurs observés en fonction de l'établissement des complexes.

1° Nature des affections constituant des enchainements.

Au début de nos travaux sur les intéractions pathologiques, nous avons pensé que certaines affections étaient prédestinées par leurs caractères à constituer une phase primaire et d'autres des complications secondaires. Cependant après avoir analysé un nombre plus élevé de cas spontanés, les catégories apparurent moins rigides. Ainsi, dans un des complexes observé chez *Lymantria dispar* et chez *Bombyx mori*, la virose à *Borrelina* constitue une première phase préparant le terrain aux bactéries septicémiques. Inversement, dans un autre cas observé également chez ces mêmes Lépidoptères, la virose n'apparaît que tardivement et secondairement à la suite de troubles métaboliques. Il en est de même pour des facteurs non infectieux telle une dysenterie à Streptocoques qui sensibilise les larves d'*Arctia caja* aux chocs thermiques. Cette dysenterie elle-même peut d'ailleurs être consécutive à une faible intoxication par substances insecticides (arséniate de plomb), ou à une action microbienne infime (inclusions cristalloïdes des bactéries du groupe *Thuringiensis*).

Ces exemples montrent que la nature des maladies pouvant participer à un enchaînement ne peut être traitée qu'en fonction de la phase complémentaire. C'est dans ce sens que nous mentionnerons les affections en rapport avec leurs rôles primaires et secondaires.

a) Phase primaire.

Les actions bactériennes sont fréquentes. Le *Bacillus cereus alesti*

(1) Nous remercions MM. GRISON, BILIOTTI, MARTOURET, FERON, HURPIN, LABEYRIE, de l'Institut National de la Recherche Agronomique, MM. LEPIGRE, BERVILLE, LAGAUDE, du Service de la Protection des Végétaux, M. LEGALL, de l'I. R. C. T., M. GINGAST, de la « Quinoléine » et MM. les Présidents de plusieurs syndicats apicoles et séricicoles de France et d'Afrique du Nord de nous avoir envoyé divers insectes sains et malades.

sous forme d'une oligo-infection sans conséquences directes, a chez *Bombyx mori* des effets tardifs du type dysenterie. D'autres souches de *Cereus* cristallophores (groupe *Thuringiensis*) entraînent des effets semblables chez divers Lépidoptères dont *Pieris brassicae, Lymantria dispar, Thaumetopoea pityocampa.*

La bactérie non sporogène *Pseudomonas septica,* peut créer une infection primaire faible chez *Rhizotrogus solstitialis* et ne réapparaître sous forme de septicémie que lorsque sa présence coïncide avec une dysenterie alimentaire.

L'action primaire des protozoaires semble aussi être une source d'affections secondaires diverses. En effet, aussi bien chez *Pieris brassicae* que chez *Gnorimoschema operculella* et chez *Bombyx mori* des troubles de métamorphoses, des infections bactériennes secondaires ou l'atrophie progressive de certains organes peuvent être consécutives à la présence de tels microorganismes. Quelques observations peu approfondies d'ailleurs, soulignent également l'influence favorisante des sporozoaires, vis-à-vis des polyèdries ou les granuloses.

A première vue, les cryptogames ne paraissent pas amener d'autres syndromes que ceux de leur propre action. Cette impression provient sans doute du fait que de telles maladies s'extériorisent habituellement d'une manière particulièrement typique. Cependant, nous avons constaté sur *Sesamia cretica* et *nonagrioïdes* ainsi que sur *Ephestia kühniella* l'image du début de pathogenèse à *Beauveria densa* déviant bientôt vers une septicémie à *Micrococcus* sp., syndrome qui ne s'installe que difficilement (montré expérimentalement) sans l'intervention primaire du champignon. De tels exemples sont plus expressifs lorsque le cryptogame a une action pathogène limitée comme c'est le cas d'*Aspergillus melleus* pour lequel nous avons vu fréquemment sur *Melolontha melolontha* l'établissement expérimental de l'enchaînement avec septicémie secondaire.

Enfin, les viroses connues comme affections aigues à extériorisations typiques nous sont apparues importantes sous leur forme chronique car elles peuvent être les causes favorisantes d'anomalies physiologiques comme les dérangements de mues ou de la nymphose, les troubles respiratoires et intestinaux, la sensibilisation vis-à-vis des effets thermiques et des infections bactériennes secondaires (exemple sur *Vanessa urticae, Bombyx mori, Lymantria dispar, Arctia caja* (Vago, 1956).

Les affections non microbiennes constituent également des phases primaires. Ainsi, les altérations thermiques peuvent entraîner, s'il s'agit de températures élevées, des dysenteries tardives chez *Bombyx mori* ou chez *Hyponomeuta padella* par exemple. Elles peuvent amener également l'atrophie progressive de plusieurs organes ainsi que provoquer au moment de la crise nymphale l'état pathologique « vers courts ».

Les dérèglements de métabolisme par un choc de froid et dont le

mécanisme enzymatologique n'est pas connu, peuvent se traduire d'une façon tardive par l'apparition de viroses aiguës sans qu'une infection directe intervienne. Ce phénomène concerne généralement les Lépidoptères et a été suivi sur *Deilephila euphorbiae, Tineola biselliella* et *Bombyx mori*.

Les intoxications sont également susceptibles d'être à l'origine de dysenteries ou de speticémies bactériennes secondaires, comme observées sur *Hyponomeuta padella* avec l'arséniate de plomb. De même sur *Bombyx mori* (ou d'autres Lépidoptères) l'état d'intoxication chronique et prolongée au fluorure de sodium, amène l'évolution spectaculaire d'une virose secondaire.

b) Phases ultérieures.

Les bactérioses surtout septicémiques peuvent apparaître à la suite de viroses en voie d'évolution et également après une maladie intestinale due à des changements brusque de pH ou à des intoxications atteignant plus particulièrement l'épithélium intestinal. Elles s'établissent facilement à la suite d'une blessure cutanée à condition que cette dernière soit en contact avec la bactérie au cours des premières heures de la guérison.

Les viroses sont également typiquement secondaires dans le cas du déclenchement après troubles métaboliques. Elles sont favorisées par les plaies cutanées, mais la période de « prise » est réduite aux quelques premières heures suivant la blessure.

Les cryptogames facultativement pathogènes constituent souvent une seconde ou troisième phase, consécutive à des atrophies immoblisant soit l'Insecte entier, soit l'intestin. Les difficultés d'expliquer l'action de ces germes dans certains cas, proviennent du fait que l'on ne prend pas en considération l'affaiblissement préalable. De tels enchaînements ont pu être reproduits sur *Melolontha melolontha* et sur *Rhizotrogus solstitialis*.

Ce sont également les cryptogames qui profitent le plus amplement des traumatismes cutanés primaires. En effet, comme nous l'avons vu sur larves de *Cetonia aurata, Melolontha melolontha, Bombyx mori, Sesamia cretica* et *nonagrioïdes*, les champignons entomophages pourvus d'enzymes agissant sur la chitine voient encore augmenter leurs chances de « prise » lorsqu'ils se trouvent au contact d'une blessure. De plus, les espèces facultativement pathogènes et peu pathogènes pour les Insectes peuvent créer des foyers locaux quand elles rencontrent des blessures en voie de guérison.

L'apparition secondaire des maladies à protozoaires a été souvent mise en évidence ; citons les cas d'apparition de pébrine chez le Ver à soie à la suite d'une infection à *Serratia*.

Les affections non parasitaires peuvent également apparaître secondairement comme nous le voyons avec l'exemple de l'asphyxie thermique

vis-à-vis de laquelle une sensibilité particulière est conférée aux larves de *P. brassicae* et de *B. mori* par l'oligo-infection à *Bacillus cereus* cristallophore. Il en est de même pour l'atrophie due soit au développement du *Streptococcus bombycis* dans l'intestin, soit à des foyers cutanés localisés de champignons peu pathogènes.

L'ensemble de ces comparaisons montre que les phases primaires ou secondaires d'un complexe peuvent être constituées par des affections de natures variées qui figurent suivant les cas au stade primaire ou au stade secondaire de l'enchaînement. Cependant, sous cette constatation d'ordre général, la position de chacune des affections au sein d'un complexe donné est strictement conditionnée par la structure même de ce dernier. Nous rappelons ici la distinction entre l'effet direct de divers facteurs écologiques sur le développement des germes pathogènes et l'enchaînement où il s'agit essentiellement d'affections pathologiques effectives rendant l'organisme malade.

2° Facteurs intermédiaires de liaison.

Nous venons d'énumérer plusieurs combinaisons observées entre différents processus pathologiques. En examinant leurs points de contacts et en recherchant le mécanisme leur permettant de se lier pour donner un enchaînement, nous avons caractérisé un certain nombre d'altérations tissulaires ou cellulaires semblant réunir les diverses phases. Nous en citons quelques types :

Dans le complexe partant d'une oligo-infection à *Bacillus cereus* et aboutissant au syndrome d'une flacherie dysentérique chez *B. mori* ou chez *P. brassicae*, l'effet cytotoxique chronique des inclusions cristalloïdes du groupe *Thuringiensis de B. cereus* constitue le départ de troubles intestinaux qui en permettant le développement du *Streptococcus bombycis*, s'aggravent ensuite par l'action de ce germe infiltré entre les cellules de l'épithélium.

Une blessure cutanée ne semble pas favoriser tous les types d'infections ultérieures par un même mécanisme. Ainsi, les bactéries et surtout les corps d'inclusion de virus, mettent à profit la possibilité momentanée d'une communication directe avec l'hémolymphe en voie de coagulation dans la plaie. Pour les cryptogames entomophages pathogènes obligatoirement ou facultativement, la consistance de la plaie semble être favorable alors que pour les espèces à virulence très réduite, cette masse mélanisée perdant tout contact avec les tissus vivants, prépare le terrain à un développement saprophytaire et facilite ainsi la formation de colonies localisées. L'adhésion des germes à la surface d'une plaie humide et la persistance de cette légère humidité sont également des facteurs à ne pas négliger en tant qu'éléments favorisants.

L'établissement de la septicémie lorsqu'une infection à *Serratia* ou à *paracoli* existe dans l'intestin au moment de l'effet subléthal de certaines substances chimiques (arséniate de plomb) est dû à l'action de ces substances vis-à-vis de l'épithélium intestinal. Cette action consiste en un éloignement des cellules épithéliales entre elles et vis-à-vis de la membrane basale avec déformation des mitochondries.

L'apparition des viroses consécutives à plusieurs processus primaires, de nature à première vue très différentes, se montre liée étroitement aux déviations du métabolisme cellulaire, consécutives à chacune de ces actions. Ici, le mécanisme intime se traduit par des réactions d'enzymes intracellulaires en fonction du rôle d'un élément préexistant portant la potentialité des virus. Le problème posé par ce mécanisme a été assimilé en pathologie comparée, à ceux de l'induction des bactériophages ou des « virus endormis » des végétaux.

Des mécanismes indirects et non caractérisés par des lésions histologiques ont pu être retenus lorsque différentes affections primaires agissent sur le déroulement d'une crise physiologique. Ainsi, pour l'action des viroses, des maladies à protozoaires, de l'asphyxie ou des dysenteries vis-à-vis de la mue nymphale, un décalage pathologique a été relevé entre le filage du cocon et le processus de la transformation en chrysalide. Le premier, retardé par l'influence des affections primaires est rendu ensuite impossible par la progression obligatoire de la nymphose déterminant une paralysie de plus en plus avancée avec formation des « vers courts ».

3° Rôle de l'intensité des affections.

L'étude de chacune des affections participant à un complexe permet de mettre en relief la rareté de processus aigus pour les premières phases.

L'oligo-infection à *Bacillus cereus alesti* en est un exemple. La dénomination même d'oligo-infection souligne déjà qu'il s'agit d'une maladie peu prononcée ou tout au moins à développement plus réduit que d'ordinaire. La deuxième phase au contraire est caractérisée par une dysenterie aiguë.

C'est aussi le cas de l'enchaînement « troubles métaboliques-viroses » dans lequel les effets primaires sont consécutifs soit à une alimentation amenant progressivement un état de déséquilibre, soit à une intoxication pour laquelle la dose est décisive car en la dépassant même légèrement, le complexe ne s'établit pas et l'affection évolue vers une intoxication aiguë. Rappelons la nécessité pour les complexes induits par le fluorure de sodium, d'établir une dose correspondant à chaque âge et à chacune des races à l'étude. Nous ne détaillerons pas les complexes amenant les

« vers courts » pour lesquels le tableau V montre une nette dépendance vis-à-vis d'une maladie primaire.

Dans les cas où le processus primaire ne paraît pas particulièrement chronique, l'enchaînement d'une affection secondaire s'établit de préférence à un stade où l'affection non encore généralisée se trouve au-dessous du seuil d'évolution rapide. Rappelons à ce sujet les modalités d'installation de septicémies consécutives à des viroses à *Borrelina* chez *Lymantria dispar, Thaumetopoea pityocampa* et *Bombyx mori*.

Le caractère chronique d'une affection apparaît ainsi comme un facteur contribuant à la prédisposition vis-à-vis de la formation de complexes. Ce fait semble d'ailleurs naturel si l'on considère qu'une pathogénèse ralentie (constituant rarement un syndrome léthal) offre plus d'occasions à l'intervention d'une seconde phase qu'une maladie aiguë dont la progression des lésions pourrait être difficilement déviée.

4° Les microbes de sortie.

L'un des phénomènes similaires de ceux de la pathologie des Vertébrés et de l'Homme, consiste en l'apparition de « microbes de sortie ». L'établissement de septicémies secondaires (observées chez *Thaumetopoea pityocampa, Lymantria dispar et Bombyx mori*) consécutives à un stade moyennement avancé de la virose à *Borrelina*, présente certaines analogies avec l'apparition finale de *Pasteurella suiseptica, Salmonella cholerae suis* et *Pseudomonas aeruginosa* après l'action du virus de la peste porcine. Il en est de même pour *Bacillus bronchisepticus* consécutif à la virose Carre, ainsi que pour une flore moins spécifique « sortie » après la pathogénèse virusale de la variole aviaire. En effet, le stade de la virose à polyèdres où la bactérie secondaire apparaît, est celui des lésions nucléaires avancées mais non généralisées. L'action bactérienne rapide constitue le syndrome léthal et la « flore de sortie » comporte des espèces plus spécifiquement adaptées à une virose, entourées par d'autres à affinité plus générale. Rappelons qu'il n'y a pas lieu de confondre les microbes de sortie participant à une action pathogène de « complications » avec une flore saprophytaire « post-mortem ».

5° Préexistence des germes.

La présence prolongée, permanente ou symbiotique de certains microorganismes chez l'Insecte malade, peut faciliter l'établissement de complexes. Ainsi, lors de l'apparition de dysenteries secondaires après l'action d'une toxine bactérienne ou d'une intoxication chronique (par des substances chimiques) et caractérisé par le développement du *Streptococcus bombycis*, la présence de ce dernier germe, jamais apporté expé-

rimentalement, est déterminante. D'après les examens de larves saines, cet entérocoque est un élément constant de la flore intestinale normale, mais sa présence minime est souvent non décelable à l'examen microscopique. Dans certains cas en effet, des prélèvements abondants sont nécessaires pour obtenir sa culture. C'est la préexistence de cette flore très réduite qui permet un développement abondant par suite de l'intervention d'une action cytotoxique primaire.

Des phénomènes analogues avec action du même microorganisme peuvent avoir lieu consécutivement à l'effet primaire d'un choc thermique ou d'une asphyxie partielle et temporaire amenant progressivement le syndrome de la flacherie.

Dans le cas particulier le déclenchement de polyèdries à la suite de troubles métaboliques, la préexistence d'un agent viral a une importance particulière. En effet, la confirmation expérimentale de celle-ci s'oppose à la théorie de formation artificielle des virus sous l'influence de réactions chimiques seules. Elle a mis d'ailleurs de tels complexes à contribution pour l'étude du problème de l'induction des virus, question d'actualité en pathologie comparée.

Enfin, l'apparition de nosémoses par suite d'une infection bactérienne, nous a amené à considérer la préexistence des protozoaires malgré l'absence de symptômes.

6° Enchaînements à phases multiples.

La plupart des complexes relatés est constitué par un processus préparatoire sur lequel se greffe une affection secondaire. Cependant, l'enchaînement n'a pas toujours cette structure relativement simple ; souvent au contraire trois ou quatre processus ou éléments peuvent s'unir d'une façon synergétique. Considérons seulement les lésions réduites de virose persistant à l'état freiné chez de nombreux Lépidoptères apparemment sains. Ce sont là des éléments précédant les effets de troubles métaboliques provoqués par des facteurs alimentaires ou des substances chimiques et qui amènent finalement une virose aiguë.

Un choc thermique primaire peut entraîner un début de dysenterie avec développement des Streptocoques, processus pouvant rester à son tour chronique pendant un certain temps. Ce n'est qu'une troisième phase constituée par la crise de la « montée » qui fait ressortir subitement une flacherie aiguë et léthale dont les lésions étaient préparées par les phases antérieures. Remarquons d'ailleurs que c'est dans cette multiplicité d'éléments à intensité variable constituant cet enchaînement, qu'ont résidé les difficultés relatives à la compréhension de l'étiologie si longtemps discutée de la flacherie.

7° Rapports chronologiques et topographiques.

L'intervention d'un élément par rapport à un autre n'amène pas toujours un enchaînement. Il faut des lésions précises à un stade précis de la progression d'un processus pour qu'une action donnée puisse s'y greffer physiopathologiquement. Ceci ne sous-entend pas forcément « la simultanéité » des processus : tout au contraire, dans la majorité des cas, un stade avancé s'enchaîne avec le début d'une autre affection dont les lésions chroniques sont des éléments prédisposants vis-à-vis d'un effet brusque et naissant.

Considérons ici le mécanisme des septicémies survenant après une virose et pour lequel le « sine qua non » du complexe est la présence au niveau de la membrane basale de *Bacterium paracoli* (facultativement pathogène) au moment où les lésions virales sont avancées mais non généralisées. En effet, à un stade plus évolué, la maladie finirait par le syndrome de la virose elle-même.

L'exemple d'enchaînement « traumatismes cutanés-infections ultérieures », est certainement l'un des plus démonstratifs. L'action favorisante d'une blessure vis-à-vis des bactéries est limitée, tout au moins dans les cas étudiés, à une période courte (souvent quelques heures) suivant immédiatement l'hémorragie. Pour certains cryptogames pathogènes au contraire, cette période dure pendant plusieurs jours et nous avons également vu que pour des champignons peu pathogènes la masse d'hémolymphe coagulée et mélanisée à la surface d'une blessure (surtout à un stade avancé de la guérison) est un point de « prise » favorable pour la création d'une infection locale.

Déjà, de ces quelques types d'exemples, se dégage l'importance capitale de l'existence simultanée à un endroit précis, d'éléments bien déterminés. Ceci nous amène à la notion de la coïncidence des affections. En effet, l'intensité d'accumulation des maladies infectieuses subit des fluctuations considérables dans le temps et dans l'espace : fait banal d'épizootiologie. Les écarts importants dans les effets climatiques, physiques ou alimentaires sont amplement étudiés en écologie et physiologie. Les considérations qui viennent d'être relatées donnent une idée sur la précision avec laquelle la « coïncidence » doit jouer aussi bien pour ces influences externes que pour celles concernant les affections intrinsèques. Il semble ainsi que cette notion est l'un des éléments importants pour l'interprétation écologique des enchaînements de maladies.

8° Relations avec l'ontogénèse.

En comparant l'apparition de conséquences secondaires chez plusieurs types de complexes, on constate la fréquence avec laquelle les phases aiguës apparaissent à certaines périodes de la vie de l'Insecte

sans que des lésions ou des influences externes puissent justifier une telle activation. De telles périodes se situent avant ou pendant les mues, au cours de la nymphose et même au moment du développement actif de l'embryon. Rapportons l'exemple, d'ailleurs détaillé dans ce travail, des conséquences d'affections subléthales de nature diverses (virose à *Borrelina*, nosémose, dysenteries, asphyxie temporaire) se traduisant uniformément au moment de la montée par l'état pathologique des « vers courts ».

Dans un autre ordre d'idées, chez plusieurs Lépidoptères, on observe des larves se mélanisant pendant les mues et ne pouvant pas ensuite effectuer normalement cette crise. Dans de tels individus appelés aussi « négrones » chez le Ver à soie, les viroses primaires faiblement développées sont particulièrement fréquentes. Dans d'autres cas, les mycoses localisées ou à action peu pathogène ont pu être décelées.

Enfin, notons que le déclenchement de viroses secondaires consécutives à des troubles métaboliques dus à un refroidissement (4°C., 72 heures) s'établit avec une efficacité triplée ou quadruplée lorsque le traitement au froid a lieu pendant la période des mues.

A la lumière de ces faits, les crises physiologiques ont dans une certaine mesure, la valeur d'un processus pathologiques favorisant la formation d'un enchaînement. Ceci souligne bien leur considération comme états para-pathologiques.

9° Influences d'ordre génétiques.

Mentionnons enfin que certaines faiblesses, des malformations tératologiques ou une sensibilité particulière peuvent être perpétuées et développées au cours de la succession des générations. Ainsi, les Insectes peuvent naître avec des propriétés, une constitution ou une potentialité ne ressortant que lorsque intervient une autre affection.

Rappelons ici le cas déjà mentionné à plusieurs reprises de l'enchaînement multiple d'affections aboutissant finalement au syndrome de la flacherie. Les différences raciales et entre lignées constituent l'un des maillons de la chaîne et n'omettons pas d'indiquer que PASTEUR avait déjà souligné pour cette maladie l'importance de la faiblesse héréditaire, sans toutefois préciser le mécanisme d'une telle influence.

D'autres éléments d'enchaînement peuvent également se transmettre d'une génération à l'autre comme c'est le cas pour *Nosema bombycis* dont la présence durant des générations peut représenter la phase primaire d'autres syndromes tel celui des « vers courts » par exemple.

***

Nous avons vu qu'un nombre considérable de facteurs est susceptible de jouer un rôle dans l'établissement des complexes. Cependant, ce n'est pas toujours et seulement le hasard qui détermine la réalisation d'un enchaînement. Selon la nature et la localisation des éléments, plusieurs catégories peuvent être distinguées.

La formation d'un complexe peut être *obligatoire* si les lésions se conditionnent mutuellement à l'échelle tissulaire ou cellulaire et si les diverses affections en jeu sont des processus intrinsèques ou appartenant à des actions microbiennes étroitement associées à l'hôte. L'oligo-infection à *Bacillus cereus* avec inclusions toxiques en est un exemple. L'effet cytotoxique concerne l'épithélium intestinal et une flore réduite de *Streptococcus bombycis* est normalement préexistante. Les troubles digestifs peuvent s'installer ainsi sans intervention de facteurs écologiques.

L'enchaînement peut être un phénomène *normal* si la probabilité de coïncidence des éléments au moment précis est élevée. On peut considérer ainsi l'apparition secondaire de virose dans un élevage de Vers à soie où l'alimentation et les conditions atmosphériques ne sont pas soigneusement contrôlées. Ici, la préexistence du virus dans les souches industrielles, l'effet activateur des troubles alimentaires et les écarts de températures sont étroitement liés au déclenchement des viroses secondaires.

L'établissement de rapports peut être *facultatif ou rare* si la probabilité de coïncidence des processus est variable ou faible. C'est le cas des enchaînements conditionnés surtout de facteurs écologiques. L'exemple du complexe « blessure-infection », est un des plus typiques. Pour certains cas, le germe n'a que quelques heures pour rencontrer une surface réduite de blessure, pour que la première phase soit profitable. Cette perspective a été choisie parmi les cas extrêmes car pour le même type d'enchaînement, la période dotée d'un effet favorisant de la blessure, peut, pour d'autres éléments microbiens, s'étendre sur de nombreux jours. La probabilité de contact avec des germes, surtout quand il s'agit de populations denses ou d'Insectes souterrains, peut aussi être élevée.

Enfin, un complexe de maladies peut être influencé d'une façon *artificielle* si après avoir étudié les liens entre les affections associées, on introduit l'un des facteurs à côté d'autres préexistants. C'est le cas des expériences que nous venons d'exposer et également l'un des sens dans lequel les notions de l'enchaînement pourraient être utilisées d'une façon pratique au point de vue technique agricole.

II. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Sur des cas spontanés de maladies d'Insectes, la pathogénèse d'un syndrome ne s'explique pas toujours par l'unité étiologique d'une affection typique. L'analyse révèle souvent les caractéristiques fonctionnelles et histologiques de plusieurs processus pathologiques à la fois.

L'association de diverses affections constituant chacune des unités étiologiques, a été obtenue expérimentalement.

L'étude des mécanismes de succession et d'intéraction des lésions histopathologiques a permis de définir des *complexes* de maladies constitués par *l'enchaînement de plusieurs phases.*

Le déroulement de certains de ces complexes a été montré en détail sur *Bombyx mori* :

Une oligo-infection avec souches cristallophores de *Bacillus cereus*, sans symptômes directs, évolue progressivement et tardivement vers le syndrome d'une flacherie dysentérique secondaire à *Streptococcus bombycis.*

Une virose intranucléaire à *Borrelina* peut se compliquer, quand elle est au stade de début de la généralisation sur les tissus sensibles, par l'évolution de septicémies à *Bacterium paracoli* et céder alors le syndrome léthal à cette dernière affection.

Les traumatismes cutanés (coupures hémorragiques, frottements, morsures) souvent bénins en eux-mêmes et suivis de puissantes réactions hémocytaires, de formation de pseudo-tissus, de coagulation et mélanisation de l'hémolymphe, offrent des facilités de développement à toute une gamme d'infections bactériennes, cryptogamiques et virales. De tels effets entraînent non seulement l'augmentation de la fréquence d'affections parasitaires, mais favorisent également la « prise » de germes normalement incapables d'agir à travers la cuticule intacte.

Certaines affections, comme les viroses à *Borrelina*, les protozoonoses à *Nosema*, les asphyxies partielles ou les pralysies thermiques temporaires, provoquent à la nymphose l'état pathologique « vers courts », si elles surviennent à un moment précis de la vie larvaire.

En déclenchant, par voie chimique ou alimentaire, des troubles métaboliques spécifiques dans certaines lignées de Lépidoptères (*Bombyx mori, Lymantria dispar, Tineola biselliella, Galleria mellonella*) on induit l'évolution progressive de viroses aiguës à polyèdres (*Borrelina*) sans l'intervention d'infection directe.

Parmi d'autres complexes types mis en évidence sur divers Insectes mentionnons une virose à *Smithia* — dysenterie chez *Arctia caja* (*Lepidoptera*), une intoxication subléthale à l'arséniate de plomb septicémie à *Serratia* ou à *Streptococcus* chez *Spilosoma* sp. (*Lepidoptera*) et chez *Blabera fusca* (*Orthoptera*), une mycose à *Aspergillus melleus* — bactériose à *Bacterium paracoli* chez *Sesamia nonagrioïdes* (*Lepidoptera*)

et des mycoses localisées à *Fusarium moniliforme* et à *Cephalosporium* sp. — atrophie léthale chez *Rhizotrogus solstitialis* et *Cetonia aurata* (*Coleoptera*).

Nous avons mis en évidence plusieurs types de mécanismes par lesquels les enchaînements s'établissent entre affections, comme l'effet cytotoxique des inclusions cristalloïdes de certaines bactéries vis-à-vis de l'épithélium intestinal, l'absorption mécanique des germes par l'hémolymphe remplissant une plaie, les conditions saprophytaires qu'offre le coagulum mélanisé d'un traumatisme cutané, le décalage pathologique entre le début du filage et la progression de la prénymphose amenant l'état « vers courts », certains troubles métaboliques agissant sur les virus préexistants et l'infiltration de germes septicémiques au travers d'un épithélium partiellement désagrégé.

Nous avons établi des rapports entre la formation des enchaînements et le caractère facultativement parasite d'une souche microbienne, la préexistence de germes chez l'Insecte, la « coïncidence » chronologique et topographique d'affections, la sensibilisation vis-à-vis des facteurs écologiques, les crises de l'ontogénèse et les influences génétiques.

Le degré de probabilité de la coïncidence de tels facteurs détermine des enchaînements *obligatoires* (liaisons intrinsèques), *normaux* (microbiotope ou adaptation), *facultatifs ou rares* (présence accidentelle d'un des éléments) et *artificiels* (éléments complémentaires apportés).

***

La mise en évidence expérimentale des enchaînements de maladies, introduit plusieurs considérations jusqu'alors non retenues en *pathologie des Insectes*.

Elle montre qu'une affection, même léthale et caractéristique ne peut pas être toujours considérée comme une entité pathologique : le déroulement d'un processus morbide peut n'être compréhensible qu'à la lumière des actions le précédant ou le compliquant.

Le diagnostic formulé d'après un syndrome défini peut ne pas avoir de signification étiologique.

L'importance d'une affection pathologique doit être évaluée non seulement d'après sa propre action, mais aussi par les conséquences secondaires qu'elle est susceptible de déclencher.

Lors d'affections atypiques ou de sensibilisations, la recherche de l'intervention d'affections primaires prédisposantes paraît justifiée.

***

Ces considérations formulées dans le domaine de la pathologie des Insectes orientent nos travaux vers la *pathologie comparée*.

En effet, les notions de « terrain », de « microbes de sortie », de

« complications », etc... ont des analogies avec les perspectives actuelles de la pathologie considérant les « *états pré-pathologiques* ».

D'autre part, les possibilités expérimentales qu'offrent les maladies des Insectes par rapport à celles des animaux supérieurs ou de l'Homme, permettent d'obtenir des renseignements sur les processus exigeant des précisions statistiques portant sur de nombreuses générations ou sur des microclimats particulièrement définis. Ainsi, le présent travail semble être, après l'étude bibliographique que nous avons effectuée, l'un des premiers consacrés d'une manière comparative, à la considération expérimentale de la structure des enchaînements pathologiques.

L'analyse du complexe, troubles métaboliques avec apparition tardive de viroses aiguës a apporté des éléments particulièrement bien assimilés en pathologie comparée. En effet, elle figure en ce moment, avec la lysogénie des bactéries, les « virus endormis » des végétaux et le virus σ de la Drosophile, comme phénomène posant le problème de l'induction des virus sans infection préalable.

Au cours de controverses sur ce sujet d'actualité, nos résultats ont été mis en opposition avec la théorie de la « production artificielle des virus » en tant qu'éléments d'une conception généralement approuvée aujourd'hui.

***

D'une façon indirecte, ces études ont des répercussions agronomiques.

En écologie des insectes nuisibles aux cultures, la prise en considération des enchaînements explique certaines influences qu'exercent les facteurs écologiques sur les populations d'insectes et cela dans le cas où une maladie est en jeu dans ces rapports. Rappelons comme exemple la combinaison entre blessures et infections cryptogamiques, particulièrement courante chez les insectes souterrains, ou encore le déclenchement massif de virose consécutif à des effets alimentaires et climatiques primaires en rapport avec des fluctuations des populations naturelles de Lépidoptères.

Dans la lutte chimique contre les insectes ravageurs, l'extériorisation secondaire et tardive de certaines intoxications sous forme de viroses et dysenteries léthales semble être à retenir.

Des complexes semblables sont susceptibles d'intervenir dans la lutte biologique mais avec une variété plus élevée de syndromes secondaires étant donné les différences d'actions considérables des germes pouvant être employés (toxine bactérienne, effets localisés, état de virose, etc...). Dans le même domaine, les mécanismes étudiés suggèrent la mise au point de traitements combinés favorisant une action synergétique et incitent à tenir compte de la préexistence d'un état pathologique dans

les populations en question. Ces considérations sont soumises aux spécialistes de la lutte biologique.

L'hygiène en entomologie montre certaines relations avec l'enchaînement des maladies d'insectes.

Le maintien de divers insectes en *élevages* (pour expérimentation ou production d'insectes entomophages) rendu généralement difficile à cause des maladies, est en liaison avec les affections primaires déclenchant des dysenteries et des viroses ainsi qu'avec l'effet de maladies chroniques sur les anomalies des crises de mues ou de nymphose. La prophylaxie visant les phases primaires a souvent permis de supprimer les syndromes apparents.

La lutte, très importante sur le plan économique, contre les épizooties des *insectes utiles* constitue l'un des aspects pratiques de ce travail.

Pour la Sériciculture, des éclaircissements étiologiques ont été obtenus sur la question de la flacherie, discutée depuis plus d'un siècle. Ils montrent expérimentalement que cette maladie est un complexe de plusieurs affections primaires de natures bactériennes et physiopathologiques tendant vers un syndrome secondaire toujours ressemblant. Après avoir précisé les moyens de prophylaxie vis-à-vis de chacun des facteurs primaires, cette maladie si redoutée à disparu des magnaneries étudiées dont le nombre dépasse cinquante à l'heure actuelle dans les divers départements séricicoles. Les Services Agricoles, le Génie Rural et les Syndicats Séricicoles généralisent progressivement les techniques mises au point depuis trois ans.

Il en est de même pour la lutte contre la maladie « vers courts » du Ver à Soie qui est améliorée par la prophylaxie de chacune des affections primaires mises en évidence au sein du complexe dont cet état anormal est le syndrome secondaire.

Enfin, la définition de l'enchaînement entre virus latents, troubles métaboliques et polyédries a abouti aux techniques de lutte contre la grasserie (maladie contre laquelle aucun moyen efficace ne permet de lutter à l'heure actuelle) par la réduction systématique des facteurs abiotiques de déclenchements apparaissant dans les éducations et par la sélection de lignées de Vers à Soie à taux d'induction faibles.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acqua (C.). — Sullo *Streptococcus bombycis* Flugge e sui rapporti colla vita del filugello. *R. C. Ac. Lincei*, **13,** p. 1, 1904.

Acqua (C.). — Ricerche intorno alla malattia della flaccidezza nel baco da seta. *Rend. Ist. Bacol. R. Scuola Sup. Agr. Portici*, **3,** p. 285, 1918.

Acqua (C.). — Flaccidezza e macilenza. *Boll. R. Staz. Sper. Gels. Bach. Ascoli Piceno*, **4**, p. 13, 1925.
Acqua (C.). — Gli studi del Paillot sulla macilenza e sulla flaccidezza. *Boll. R. Staz. Sper. Gels. Bach. Ascoli Piceno*, **6**, p. 32, 1927 *a*.
Acqua (C.). — Intorno allo Streptococco del Bombice del Gelso. *Boll. R. Staz. Sper. Gels. Bach. Ascoli Piceno*, **6**, p. 223, 1927 *b*.
Acqua (C.). — Sulla natura della malattia della flaccidezza. *Boll. R. Staz. Sper. Gels. Bach. Ascoli Piceno*, **6**, p. 1, 1928.
Acqua (C.). — Les maladies du Ver à soie par A. Paillot et nos études sur le même sujet. Ascoli Piceno, p. 36, 1929.
Acqua (C.). — Il bombice del gelso. G. Cesari, Ascoli Piceno, p. 373, 1930.
Acqua (C.). — In tema di flaccidezza. *Boll. R. Staz. Sper. Gels. Bach. Ascoli Piceno*, 11, p. 94, 1932.
Allegret (P.). — Incidences sur la nymphose de troubles expérimentaux de la sécrétion de soie au cours du dernier stade chez la fausse teigne des ruches (*Galleria mellonella L.*). *Actes VII. Congr. Ser. Inter.*, Alès, p. 3, 1948.
Allegret (P.). — Influence de la rétention expérimentale de la soie sur la métamorphose de *Bombyx mori* L., *C. R. Acad. Sc.*, **232**, p. 268, 1951.
Allegret (P.). — Influence de la rétention expérimentale de la soie sur la métamorphose de *Galleria mellonella* L., *C. R. Acad. Sc.*, **238**, p. 623, 1954.
Andrewes (C. H.). — The action of immune serum on vaccinia and virus III in vitro. *J. Path. Bact.*, **31**, p. 461, 1928.
Angus (T. A.). — A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. *Nature*, 173, p. 545, 1954.
Anonyme. — L'art de multiplier la soie ou traiter sur les mûriers blancs, l'éducation des Vers à soie et le tirage des soies. Aix, p. 86 et 91, 1760.
Aoki (K.). — Uber das Toxin von sog. Sotto-Bazillen. *Mitt. mediz. Fakult. Kais. Univers. Tokyo.*, **14**, p. 59, 1915.
Aoki (K.). — Uber atoxogene Sotto-Bazillen. *Bull. Imp. Ser. Exp. St. Tokyo*, **1**, p. 141, 1916.
Aoki (K.). — Experimentelle Untersuchungen der Bakterieninfektion bei Seidenraupen. *Centrbl. Bakt. Parasit. Infect.*, p. 41, 1926.
Aoki (K.) et Chigasaki (Y.). — Uber die Pathogenität der sog. Sotto-Bazillen (Ishiwata) bei Seidenraupen. *Mitt. mediz. Fak. Kaiser Univers. Tokyo*, **13**, p. 419, 1915.
Aoki (K.) et Chigasaki (Y.). — Uber die Anwendbarkeit der Agglutinationsreaktion bei der bakteriologischen Untersuchung von Seidenwürmern. *Bull. Imp. Stat. Ser. Tokyo*, **1**, p. 83, 1916.
Aoki (K.) et Chigasaki (Y.). — Sur la toxine des microbes « sotto ». *Bull. Ass. Ser. Japon, Tokyo*, **8**, p. 1, 1916.
Aoki (K.) et Yamonoushi (T.). — On the bacteria found in the spring silkworms suffering from sporadic acute flacherie. *Rtp. Imp. Exp. Stat. Ser. Nakano*, **4**, p. 1, 1917.
Arbousset (E. L'). — Cours de Sériciculture pratique, Alès, p. 213, 1893.
Arnaud (M.). — Recherches préliminaires sur les champignons entomophytes. *Ann. Epiphyties*, **13**, p. 1, 1927.
Béchamp (A.). — Sur la maladie à microzymas des Vers à soie à propos d'une récente communication de M. Pasteur. *C. R. Acad. Sc.*, **67**, p. 102, 1868.
Béchamp (A.). — Sur l'origine de la maladie microzymateuse des Vers à soie, *Rev. un. de. Ser.*, p. 196, 1869.
Bergold (G. H.). — Uber Polyederkrankheiten bei Insekten. *Biol. Zbl.*, **63**, p. 1, 1943.
Bergold (G. H.). — Uber Isolierung des Polyeder-Virus und die Natur der Polyeder. *Z. Naturforsch.*, **2**, p. 122, 1947.

BERGOLD (G. H.). — Insect viruses. *Adv. in Virus Res.*, **1**, p. 129, 1953.
BERLINER (E.). — Uber die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kühniella*, ZELL.) und ihren Erreger, *Bacillus thuringiensis n. sp. Z. Angew. Entomol.*, **2**, p. 29, 1915.
BOISSIER DE SAUVAGES (P. A.). — L'art d'élever les Vers à soie, Avignon, p. 240, 1788.
BOLLE (C.). — Allevamenti diretti ad indagare l'influenza esercitata sul seme da fermenti (micrococci) riscontrati nelle crisalidi e nelle farfalle. *Ann. Ist. Bac. Gorizia*, p. 20, 1873.
BOLLE (C.). — Studi sulla flaccidezza. *Atti. Mem. Inst. R. Agr. Gorizia*, p. 2, 1878.
BOLLE (C.). — L'allevamento razionale del Baco da seta e la coltura del gelso. Gorizia, p. 124, 1913.
BOLLE (C.). — La flaccidezza, *Allevamenti*, **3**, p. 400, 1922.
BOLLE (C.) et RICHTER (M.). — Studien über die Schlaffsucht. Gorizia, p. 2, 1902.
BOLLE (C.) et RICHTER (M.). — Studen über die Ursache der Schlaffsucht der Seidenraupe. *Centralb. Bakt. Parasit.*, **33**, p, 735. 1903.
BONAFOUS (M.). — Traité de l'éducation des Vers à Soie de la culture du mûrier, suivi de divers mémoires sur l'art séricicole, Paris, p. 99, 1840.
BORCHERT (A.). — Uber die Nosemainfektion der Honigbiene unter besonderer Berücksichtigung der Nosemaseuche. *A. F. Bienenk.*, n° 11, p. 1-9, 1930.
BOULLENOIS (F.). — Conseils aux éducateurs de Vers à soie, Paris, p. 183, 1875.
BRUN (G.) et SIGOT (A.). — Étude de la sensibilité héréditaire au CO_2 chez la drosophile. II. Installation du virus σ dans la lignée germinale à la suite d'une inoculation. *Ann. Inst. Pasteur*, **88**, p. 488, 1955.
BUONOCORE (C.). — I. Riccioni. *Boll. R. Staz. Sper. Gels. Bachi. Ascoli Piceno*, **16**, p. 1, 1937.
BURNSIDE (C. E.). — Studies on the bacteria associated with European foulbrood. *J. Econ. Entom.*, **27**, p. 656, 1934.
CAPPELLATO (M.). — Sull'appartenenza del Cosidetto *Streptococcus bombycis* al genere *Enterococcus. Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **23**, p. 924, 1947.
CAVARA (F.). — Di due microrganisme util per l'agricoltura. *Bull. Soc. Bot. Ital.*, p. 241, 1899.
CHARREL (J.). — Traités des magnaneries. Paris, p. 123, 1848.
CHIGASAKI (Y.). — Bacteriological observations on an outbreak of flacherie which occurred during the fourth moulting stage. *Rep. Of. Imp. Ser. Exp. Nakano*, **6**, p. 1, 1922.
COLLIER (W. A.). — Polyeder-virus bei *Argynnis lathonia L. Entom. Beit. Berlin*, **1**, p. 56, 1934.
COMBE (P.). — Éducation du Ver à soie. Bagnols, p. 201. 1844.
CONTE (A.). — Rapport sur pébrine et flacherie. *Publ. Minist. Inst. Publ.*, p. 153, 1914.
CONTE (A.) et LEVRAT (D.). — Les maladies du Ver à soie. La grasserie. *Trav. Lab. Et. Soie. Lyon*, **13**, p. 41, 1909.
CRUMB (S. E.). — Tobacco cutworms. *U. S. D. A. Tech. Bull.*, **88**, p. 179, 1929.
DANDOLO. — L'art d'élever les Vers à Soie, Paris, p. 282, 1861.
DAY (M. F.). — Wound healing in the gut of the cockroach. *Austr. J. Sci. Res.*, **5**, p. 283, 1952.
DAY (M. F.) et BENNETTS (M. J.). — Healing of Got wounds in the mosqui to *Aedes aegypti* (L.) and the Leafhopper *Orosius argentatus* (*EV*). *Austr. J. Biol. Sci.*, **6**, p. 580, 1953.
DELACROIX (C.). — *Oospora destructor*, champignon produisant sur les insectes muscardine verte. *Bull. Soc. Mycol.*, **9**, p. 260, 1893.
DELAPORTE (B.), BÉGUIN (S.). — Étude d'une souche de *Bacillus* pathogène pour certains Insectes, identifiable à *Bacillus thuringiensis* BERLINER. *Ann. Inst. Pasteur*, **89**, p. 632, 1955.

Donatien (A.) et Lestoquard (F.). — Recherches sur l'immunisation contre la peste porcine. *Ann. Inst. Pasteur,* **43,** p. 1560, 1929.

Drilhon (A.), Busnel (R. G.) et Vago (C.). — Les acides aminés libres et les substances fluorescentes du sang et des tubes de Malpighi de la chenille de *Bombyx mori* L. atteinte de la maladie à polyères et de la flacherie. *C. R. Acad. Sc.,* **232,** p. 360,1951.

Drilhon (A.) et Vago (C.). — Modifications dans la figure chromatographique des acides aminés libres et des substances fluorescentes de l'hémolymphe du *Bombyx mori* L. consécutives à une paralysie d'origine microbienne. *Experientia,* **9,** p. 143, 1953.

Drilhon (A.) et Vago (C.). — Discrimination entre deux types étiologiques de la flacherie chez *Bombyx mori.* Diagnostics différentiels par l'électrophorèse. *C. R., Soc. Biol.* **149,** p. 39, 1955.

Dufresnoy (J.). — Les formes de dégénérescence des chenilles de *Cnethocampa pityocampa* parasitées. *C. R. Soc. Biol.,* **82,** p. 288, 1919.

Escherich (K.) et Miyajima (M.). — Studien über die Wipfelkrankheit der Nonne. *Naturw. Z. Forst. u. Landw.,* **9,** p. 381, 1911.

Ferry de la Bellone. — Recherches expérimentales sur les causes de la flacherie du Ver à soie. *C. R.* 6 *Congrès Intern. Seric. Paris,* p. 113, 1788.

Foa (A.). — L'épitelio dell intestino medio nel baco da seta sano e in quello malato di flaccidezza. *Rend. Ist. Bac. R. Sc. Agric. Portici.,* **3,** p. 41, 1918.

Fraisse (R.). — La croissance de la tête chez la larve du *Bombyx mori* L. en fonction du régime alimentaire. *C. R. Acad. Sc.,* **236,** p. 1613, 1953 *a.*

Fraisse (R.). — Alimentation et croissance de la larve chez *Bombyx mori* L. *Rev. Ver à Soie,* **5,** p. 31, 1953 *b.*

Friederichs (K.). — *Metarrhizium anisopliae. Agr. News,* **13,** p. 78(Réf.),1914.

Fuschini (C.). — Sono possibili interventi efficaci contro la flaccidezza. *Boll. R. Staz. Gels. Bach. Ascoli Piceno,* **4,** p. 238, 1925.

Fuschini (C.). — A proposito della flaccidezza. *Il baco da seta,* p. 15, 1926.

Giorgi (M.) et Falleroni (D.). — Ricerche intorno alla macilenza del baco da seta. Lab. Batt. San. Publ. Roma, p. 5, 1904.

Glaser (R. W.). — Wilt of gypsy moth caterpillars. *J. Agr. Res.,* **4,** p. 101, 1915.

Glaser (R. W.). — On the existence of immunity principles in insects. *Psyche,* **25,** p. 39, 1918*a.*

Glaser (R. W.). — A new bacterial disease of gypsy-moth caterpillars. *J. Agr. Res.,* **13,** p. 515, 1918*b.*

Glaser (R. W.). — A bacterial diseases of silkworm. *J. Bacter ;* **9,** p. 339, 1924.

Glaser (R. W.). — The green muscardine disease in silkworms. *Ann. Entom. Soc. Amer.,* **19,** p. 180, 1926.

Glaser (R. W.). — Studies on the polyhedral diseases of insects due to filtrable viruses. *Ann. Entom. Soc. Amer.,* **20,** p. 319, 1927.

Glaser (R. W.) et Chapman (J. W).. — Studies on the wilt disease or « Flacherie » of the gypsy moth. *Science,* **36,** p. 219, 1912.

Glaser (R. W.). — The wilt disease of gypsy moth caterpillars. *J. Econ. Entomol.,* **6,** p. 479, 1913.

Glaser (R. W.) et Chapman (J. W.). — A preliminary list of insects which have wilt. *J. Econ. Entomol.,* **8,** p. 140, 1915.

Glaser (R. W.) et Chapman (J. W.). — Further studies on wilt of gypsy moth caterpillars. *J. Econ. Entomol.,* **9,** p. 149, 1916.

Gourdon de Nages. — L'art d'élever les Vers à soie. Nîmes, p. 62, 1852.

Grandori (R.). — Studi sulla flaccidezza del bombice del gelso. *Ann. R. Staz. Bac. Sper. Padova,* **44,** p. 305, 1924*a.*

Grandori (R.). — Difference morfologiche dell'ovocite e nell' uovo di *Bombyx mori* sano e malato di flaccidezza. *Ann. R. Staz. Bacol. Sper. Padova,* **44,** p. 314, 1924 *b.*

GRATIA (A.) et PAILLOT (A.). — Étude sérologique du virus de la grasserie des Vers à soie isolé par ultracentrifugation. *Arch. ges. Virusforsch.*, **1**, p. 130, 1930.

GREGORI. — Ricerche intorno all'ereditariétà della flaccidezza nei bachi da seta. *Atti Congr. Rovereto*, p. 1, 1874.

GRISON (P.). — Effets de la qualité de l'alimentation sur divers caractères physiologiques de deux Lépidoptères. *C. R. Acad. Sc.*, **242**, p. 414, 1956.

GRISON (P.) et LABEYRIE (V.). — Effet de l'humidité sur le tissage des nids chez le *Bombyx Cul-brun* (*Euproctis phaeorrhaea* DON). *C. R. Soc. Biol.*, **142**, p. 609, 1948.

GRISON (P.) et VAGO (C.). — La régulation des infestations de chenilles processionnaires du pin par les maladies à virus. *C. R. Acad. Agr.*, **59**, p. 485, 1953.

GROENEWEGE (A.). — Bestrijding van Insectenplagen net suikerriet door Schimmels ne Bacterien. *Med. v. Proff. Java-Suikerind*, **6**, p. 1, 1916.

GUILLEMAIN (A.). — Découverte de la localisation d'un gène empêchant la multiplication du virus de la sensibilité héréditaire au CO_2 chez *Drosophila melanogaster*. *C. R. Acad. Sc.*, **236**, p. 1085, 1953.

HABERLANDT (F.). — Indizi esterni della flaccidezza. *Ser. Austriaca, Gorizia*, p. 10, 1872.

HANNAY (C. L.). — Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria. *Nature*, **172**, p. 1004, 1953.

HARTMAN (E.). — A flacherie disease of silkworms caused by *Bacillus bombysepticus n. sp. Lignan. J.*, **10**, p. 279, 1913.

HAUDUROY (P.). — Les virus endormis. Problèmes actuels de virologie. Masson, Paris, p. 44, 1954.

HEIDENHAIN (M.). — Uber Kern und Protoplasma. *Festschr. Kölliker*, p. 1, 1892.

HEIM (R.). — Catalogues des Collections vivantes, herbiers et documents. II. La mycothèque. Mus. Nat. Hist. Natur., Paris, p. 5, 1949.

HERGULA (B.). — Recent experiments on the application of *Metarrhizium anisopliae* against the corn borer. *Inter. corn borer. Invest. Sci. Repts.*, **4**, p. 46, 1931.

HOLLANDE (A. C.). — Contribution à l'étude du sang des coléoptères. *Arch. Zool . Exptl. Gén.*, **2**, p. 271, 1909.

HOLLANDE (A. C.). — Étude histologique comparée du sang des Insectes à hémorrhée et des Insectes sans hémorrhée. *Arch. Zool. Exptl. Gén.*, **6**, p. 283, 1911.

HOLMES (F. O.). — Order Virales. The filtrable viruses. Bergey's manual of determinative bacteriology. Baltimore, p. 1529, 1948.

HONDA (J.). — Bacteriological examination of silkworms suffering from a form of flacherie, called Funzumaribyo. *Rep. Imp. Ser. Exp. St. Nakano*, p. 1, 1921.

HUFF (C. G.). — Immunity in invertebrates. *Physiol. Rev.*, **20**, p. 68, 1940.

ITO (T.). — Studies on the integument of the silkworm *Bombyx mori VI. Cytologia*, **18**, p. 105, 1953.

IWABUCHI (H.). — Studies on the *Sotto Bacillus* compared with the Foul brood *Bacillus* of Bee. *Bull. Imp. Inst. Ser. Tokyo*, **50**, p. 1, 1913.

JERMOLAJEW (M. F.). — Veränderlichkeit der Lebensformen der Mikroben und Viren aus Insekten. *Agrobiologja (U. R. S. S.)*, **4**, p. 89, 1953.

JOHNSON (J. R.). — The entomogenous fungi. *Bd. Comm. Agr. Govt. Porto-Rico*, **10**, p. 33, 1915.

JOLY (N.). — Études sur les maladies des Vers à soie et sur la coloration des cocons par l'alimentation au moyen de la Chica. *C. R. Acad. Sc.*, p. 47, 1858.

JONES (J. C.). — Hemocyte types *Tenebrio* (Coleoptera). *Iowa State Coll. Jour. Sci.*, **23**, p. 355, 1950.

KRASSILSTSCHIK (I. M.). — Sur les parasites des Vers à soie sains et malades. Contribution à l'étude de la flacherie de la grasserie et de la pébrine. *Mem. Soc. Zool. Fr.*, **10,** p. 513, 1896.

KRASSILSTSCHIK (I. M.). — De insectorum morbis qui fungi parasitis efficiunter. *Mem. Soc. Nat. Russ. Odessa*, p. 97, 1886.

KRASSILSTSCHIK (I. M.). — La production industrielle des parasites végétaux pour la destruction des insectes nuisibles. *Bull. Sci. France*, **19,** p. 461, 1888.

KOVACEVIC (Z.). — The importance of the polyhedry for he mass appearance of some insects. *Zastita bilja*, **23,** p. 3, 1854.

KOVACEVIC (Z.) et SCHMIDT (L.). — Einfluss der Nahrung auf die Populationsdynamik einiger polyphagen Schädlinge. *Landw. Forstw. Fak. Zagreb*, p. 15, 1956.

KRIEG (A.). — Untersuchungen über die Polyedrose von *Neodiprion sertifer* (GEOFFR). *Arch. Ges. Virusf.*, **6,** p. 172, 1955*a*.

KRIEG (A.). — Zur Frage einer « Künstlichen Virus-Erzeugung » in *Bombyx mori*, *Naturw.*, **21,** p. 589, 1955*b*.

KRIEG (A.). — « Endogene Virusentstehung » und Latenzproblem bei Insektenviren. *Arch. f. Ges. Virusforsch.*, **6,** p. 472, 1956.

LECLERC (L.). — Écoliers et Vers à soie, Paris, p. 238, 1850.

LEFREBVRE (C. L.). — Preliminary observations on two species of *Beauveria* attacking the corn borer, *Pyrausta nubialis* HUBNER, *Phytopath.*, **21,** p. 1115, 1931.

L'HÉRITIER (Ph.). — Genoïde sensibilisant la Drosophile à l'anhydride carbonique. In « Unités biologiques douées de continuité génétique ». C. N. R. S., Paris, p. 113, 1949.

L'HÉRITIER (Ph.). — Le virus héréditaire de la Drosophile. Problèmes actuels de virologie, Masson, Paris, p. 88, 1954.

L'HÉRITIER (Ph.). — Les virus intégrés et l'unité cellulaire. *Ann. Biol.*, **31,** p. 481, 1955.

L'HÉRITIER (Ph.) et HUGON DE SCOEUX (F.). — Transmission par greffe et injection de la sensibilité héréditaire au gaz carbonique chez la Drosophile. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **81,** p. 70, 1947.

L'HÉRITIER (Ph.) et PLUS (N.). — Inactivation par les rayons X du virus responsable de la sensibilité au CO^2 chez la Drosophile. *C. R. Acad. Sci.*, **231,** p. 192, 1950.

L'HÉRITIER (Ph.) et SIGOT (A.). — Contribution à l'étude du phénomène de la sensibilité au CO^2 chez la Drosophile. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **80,** p. 171, 1946.

L'HÉRITIER (Ph.) et TEISSIER (G.). — Une anomalie physiologique héréditaire chez la Drosophile. *C. R. Acad. Sc.*, **205,** p. 1099, 1937.

LÉPINE (P.). — Chorioméningite lymphocytaire de la souris. Les ultravirus des maladies animales. Maloine, p. 929, 1943.

LÉPINE (P.) et CROISSANT (O.). — Application de la technique histologique à la microscopie électronique. *Bull. Microsc. Appl.*, **3,** p. 141, 1953.

LÉPINE (P.) et SAUTTER (V.). — Études sur la pneumopathie des cobayes. *Ann. Inst. Pasteur*, **71,** p. 102, 1945.

LESPERON (L.). — Recherches cytologiques et expérimentales sur la sécrétion de la soie et sur certains mécanismes excréteurs chez les insectes. *Arch. Zool. Expr. et Gen.*, **75,** p. 128, 1937.

LETJE (W.). — Das Gelbsuchtsproblem bei den Seidenraupen. *Seiden bauforschung*, **1,** p. 58, 1939.

LEVADITI (C.), LÉPINE (P.) et VERGÉ (J.). — Les ultravirus des maladies animales. Maloine, Paris, p. 606, 1943.

LÉVI (A.). — Intorno al morbo dei morti passi. Congr. Ser. Udine dans Rap. Min. Agr. Maillot. Masson, Paris, p. 15, 1871.

LIMASSET (P.), CORNUET (P.) et MARTIN (C.). — Le diagnostic sérologique de la mosaïque du dahlia. *Proc. Conf. Potato Virus dis. Flowerbuld.*, 1951.
LOMBARDI (P. L.). — Puo l'azione del freddo diminuire la mortalita nei bachi affetti da flaccidezza. *Inform. Ser. Roma*, **2**, p. 1, 1918.
LOMBARDI (P. L.). — La presenza di innumerevoli spore di batteri nei corpo della farfalle ed il loro significato. *Boll. R. Staz. Gels. Bach. Ascoli Piceno*, **1**, p. 87, 1922.
LURIA (S. E.). — General virology. John Wiley and Sons, p. 349, 1953.
LWOFF (A.), SIMINOVITCH (L.) et KJELDGAARD (N.). — Induction de la production de bactériophage chez une bactérie lysogène. *Ann. Inst. Pasteur*, **79**, p. 815, 1950.
LWOFF (A.). — The nature of Phage reproduction. Symp. Soc. Microbiol. Oxford University Press, p. 149, 1952.
LWOFF (A.). — Lysogeny. *Bact. Rev.*, **17**, p. 269, 1953.
MACCHIATI (L.). — Sui batteri della flaccidezza. *Boll. R. Staz. Agr. Modena*, p. 109, 1891 *a*.
MACCHIATI (L.). — Contribuzione alla biologia dei batterii dei bachi affetti da flaccidezza. *Staz. Sper. Agr. Ital.*, **21**, p. 2, 1891 *b*.
MACCHIATI (L.). — Lo *Streptococcus bombycis* (PASTEUR) FLUGGE e la flaccidezza del baco da seta. *Staz. Sper. Agr. Ital.*, **23**, p. 1, 1892.
MACCHIATI (L.). — La selezione al microscopo per la flaccidezza del baco da seta. *Staz. Sper. Agr. Ital.*, **24**, p. 1, 1893.
MACLEOD (D. M.). — Investigations on the genera *Beauveria* VUILL and *Tritirachium* LIMBER. *Can. J. Bot.*, **63**, p. 57, 1954 *a*.
MACLEOD (D. M.). — Natural and cultural variation in entomogenous fungi imperfecti. *Ann. N. Y. Acad.*, **60**, p. 58, 1954 *b*.
MAESTRI (A.). — Framm. anat. pat. del Baco da seta. Pavia, p. 126, 1856.
MAILLOT (E.). — Sur la flacherie. *Act. Mém. 4. Congr. Int. Montpellier*, p. 146, 1875.
MAILLOT (E.). — Rapport sur le congrès sériciole international tenu à Sienne du 15 au 20 août 1881. Paris, Imp. Nat., p. 10, 1882.
MALLORY (F. B.). — A contribution to staining methods. *Journ. of Exper. Med.*, p. 15, 1900.
MASERA (E.). — Il « *Bacterium prodigiosum* » L. et N. « nella patologia del baco da seta ». *Ann. R. Staz. Bac. Sper., Padova*, **47**, p. 90, 1934.
MASERA (E.). — Le malattie infettive degli insetti e loro indice bibliografico. Liciono Cappelli, Bologna, p. 6, 1936.
MATSUMURA (S.). — On the « Kutho-disease » a kind of flacherie which attacks mainly young larvae of the silkworm *Bombyx mori*, **11**, *Congr. Zool. Padova*, p. 1, 1930.
MATTES (O.). — Parasitare Krankheiten der Mehlmottenlarven und Versuche über ihre Verwendbarkeit als biologisches Bekämpfungsmittel. *Sitzber. Ges. Naturw. Marburg.*, **62**, p. 381, 1927.
METALNIKOV (S.). — Les changements des éléments du sang de la chenille (*Galleria mellonella*) pendant l'immunisation. *C. R. Soc. Biol.*, **86**, p. 350, 1922.
METALNIKOV (S.) et TOUMANOFF (C.). — Experimental researches on the infection of *Pyrausta nubialis* by entomophytic fungi. *Internat. Corn. Borer. Repts*, **1**, p. 72, 1928.
METCHNIKOFF (E.). — Diseases of the larva of the grain weevil. Insects harmful to agriculture. Odessa, p. 32 (Rf), 1879.
METCHNIKOFF (E.). — Zur Lehre über Insektenkrankheiten. *R. Zool. Anz.*, **3**, p. 44, 1880.
MORGENTHALER (O.). — Die ansteckende Früjahrschwindsucht (Nosema, Amoben-Infektion) der Bienen, *Schw. Bien. Z.*, n° 3, p. 4, 1939.
MOZZICONACCI (A.). — Contagion de la flacherie. *Agr. des Cévennes*, n° 507, 1909.
MOZZICONACCI (A.). — Les principes généraux et la pratique du grainage. Alès, p. 3, 1911.

Mozziconacci (A.). — Recherches sur l'influence héréditaire de la flacherie. *Agr. des Cévennes*, n° 351, 1914.

Northrup (Z.). — A bacterial disease of june beetle larvae. *Bull. Mich. Agr. Exp. St.*, **18**, p. 38, 1914 *a*.

Northrup (Z.). — A bacterial disease of the june beetles. *Zbl. Bact. Paras. Inf.*, **18**, p. 322, 1914 *b*.

Nysten (P. H.). — Recherches sur les maladies des Vers à soie et les moyens de les prévenir. Paris, p. 103 et 115, 1808.

Oberling (J.). — La théorie virusale du cancer à la lumière des recherches récentes. *Brux. Med.*, **32**, p. 1649, 1952.

Ohmori (J.). — Sur la réponse de M. Sawamura au sujet de ses études sur la flacherie. *Bull. Ass. Ser. Jap.*, n° 137, 1903 *a*.

Ohmori (J.). — Critique sur le résultat d'études sur la flacherie écrit par S. Sawamura. *Bull. Ass. Ser. Japon*, n° 135, 1903 *b*.

Paillot (A.). — Cytologie du sang des chenilles de Macrolepidoptères. *C. R. Acad. Sc.*, **169**, p. 202, 1919.

Paillot (A.). — Sur la flacherie du Ver à soie. *C. R. Soc. Biol.*, **95**, p. 1370, 1926 *a*.

Paillot (A.). — Sur l'étiologie et l'épidémiologie de la gattine du Ver à soie ou « maladie des têtes claires ». *C. R. Acad. Sc.*, **183**, p. 251, 1926 *b*.

Paillot (A.). — Sur la flacherie du Ver à soie et ses causes. *C. R. Acad. Sc.*, **183**, p. 402, 1926 *c*.

Paillot (A.). — Sur la gattine expérimentale du Ver à soie. *C. R. Acad. Sc.*, **184**, p. 705, 1927 *a*.

Paillot (A.). — Sur l'épidémiologie de la gattine du Ver à soie et de la flacherie vraie ou flacherie de Pasteur. *C. R. Soc. Biol.*, **97**, p. 766, 1927 *b*.

Paillot (A.). — Vue d'ensemble sur les affections du tube digestif chez le Ver à soie, méthodes pratiques pour les éviter. *C. R. Acad. Agr.*, **12**, p. 37, 1927 *c*.

Paillot (A.). — Les maladies du Ver à soie, grasserie et dysenterie. Serv. Photog. Univers. Lyon, p. 192, 1928.

Paillot (A.). — Traité des maladies du Ver à soie. G. Doin, Paris, p. 279, 1930.

Paillot (A.). — Sur la gattine du Ver à soie. *C. R. Acad. Sc.*, **193**, p. 211, 1931.

Paillot (A.). — L'infection chez les insectes. Trevoux, p. 135, 1933.

Paillot (A.). — Un nouveau type de maladie à ultravirus chez les insectes. *C. R. Acad. Sc.*, **198**, p. 204, 1934 *a*.

Paillot (A.). — Les dysenteries infectieuses du Ver à soie. *Ann. Inst. Pasteur*, **53**, p. 290, 1934 *b*.

Paillot (A.). — Contribution à l'étude des maladies intestinales du Ver à soie. Deux types nouveaux de dysenterie non infectieuse. *Ann. Inst. Pasteur*, **54**, p. 627, 1935.

Paillot (A.). — Contribution à l'étude des maladies à ultravirus des insectes. *Ann. Epiph.*, **22**, p. 341, 1936.

Paillot (A.). — Les travaux de Pasteur sur la flacherie et les théories modernes sur la pathologie du tube intestinal du *Bombyx* du mûrier. *Ann. Epiph.*, **7**, p. 97, 1942.

Paillot (A.) et Gratia (A.). — Application de l'ultracentifugation à l'isolement du virus de la grasserie des Vers à soie. *C. R. Soc. Biol.*, **128**, p. 1178, 1938.

Pasqualis (G.). — Sulla ereditarietà e contagiosità della flaccidezza. *Boll. di. Ser. Milano*, p. 10, 1899.

Pasteur (L.). — Note sur la maladie des Vers à soie désignés vulgairement sous le nom de morts-blancs ou morts-flats. *C. R. Acad. Sc.*, **66**, p. 1289, 1868.

PASTEUR (L.). — Résultats des observations faites sur la maladie des morts-flats, soit héréditaire, soit accidentelle. *C. R. Acad. Sc.*, **68,** p. 1229, 1869.

PASTEUR (L.). — Étude sur la maladie des Vers à soie, moyen pratique assuré de la combattre et d'en prévoir le retour. Gauthier-Villars, Paris, p. 179, 1870.

PETTIT (R. H.). — Studies in artificial cultures of entomogenous fungi. *Bull. Agr. Exp. Stat. Cornell.*, **97,** p. 337, 1895.

POSPELOV (V. P.). — Flacherie (septicaemia) of the larvae of *Agrotis segetum* SCHIFF. *Rept. Bur. Appl. Entomol.*, **3,** p. 1. (Réf.), 1927.

PLUS (N.). — Étude de la multiplication du virus de la sensibilité au gaz carbonique chez la Drosophile. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **88,** p. 248, 1954.

PLUS (N.). — Étude de la sensibilité héréditaire au CO^2 chez la Drosophile. I. Multiplication du virus σ et passage à la descendance après inoculation ou transmission héréditaire. *Ann. Inst. Pasteur*, **88,** p. 347, 1955.

QUATREFAGES (A.). — Études sur les maladies actuelles du Ver à soie, Masson, Paris, p. 272, 1859.

RAULIN (J.). — De l'influence propre de la saison sur le phénomène de la flacherie, *Act. 4. Congr. Seri. Intern. Montpellier*, p. 112, 1874.

RAULIN (J.). — Observations sur la flacherie. *Act. Congr. Ser. Intern. Montpellier*, p. 252, 1875.

RIVERS (Th. M.) et TILLET (W. S.). — Futher observation on the phenomena encoutered in attempting to transmit varicella to rabbit. *Journ. Exp. Med.*, **39,** p. 777, 1924.

ROBINET (M.). — Manuel de l'éducateur de Vers à soie, Paris, p. 225, 1848.

ROEGNER-AUST (S.). — Der Infektionsweg bei der Polyederkrankheit der Nonne. *Naturwissensch.*, **34,** p. 158, 1947.

RORER (J. B.). — The green muscardine of froghoppers. *Proc. Agr. Soc. Trin.*, **10,** p. 467, 1910.

RORER (J. B.). — The use of the green muscardine in the control of some sugar cane pests. *Phytopath.*, **3,** p. 88, 1913.

ROUX (J. F.) et GRAVILLON (A. DE). — Les Vers à soie. Traités pratiques, graines, éducation, histoire, Lyon, p. 117, 1857.

RUTGERS (A. A. L.). — Infectieproeven meteen Schimmel die Pathogen is woor Insecten. *Med. Lab. Voor. Plantenziek.*, nº 25, 1916.

SARTIRANA (S.) et PACCANARO (A.). — Der *Streptococcus bombycis* in Bezug auf die Aetiologie der Auszehrung und Schlaffsucht der Seidenraupe. *Centralbl. Bak.*, **40,** p. 207, 1905.

SAWAMURA (S.). — Résultats d'études sur la flacherie émis par M. OHMORI. *Bull. Ass. Ser. Jap.*, nº 138, 1903 *a*.

SAWAMURA (S.). — Réponse à la critique de M. J. OHMORI. *Bull. Ass. Ser. Jap.*, nº 140, 1903 *b*.

SAWAMURA (S.). — Sur la flacherie. *Bull. Ass. Ser. Jap.*, nº 139, 1903 *c*.

SCHVETZOVA (O. I.). — La polyèdrie de *Galleria mellonella* L. et le rôle des facteurs alimentaires chez les viroses d'insectes. *Mikrobiologia*, **19,** p. 532. (Réf.), 1950.

SIMMONS (S. W.). — Digestive enzymes in the larva of the cattle grub *Hyporderma lineatum* (DE VILLIERS). *Ann. Ent. Soc. Amer.*, **32,** p. 621. 1939.

SMITH (G.) et RAISTRICK (H.). — An introduction to industrial mycology, Edward Arnold, London, p. 172, 1947.

SMITH (K. M.). — Recent advances in the study of plant viruses. Churchill, London, p. 20, 1933.

SMITH (K. M.). — Latency in viruses and the production of new virus diseases. *Biol. rev.*, **27,** p. 347, 1952.

Smith (K. M.) et Wyckoff (R. W. G.). — Structure within polyhedra associated with insect virus diseases, *Nature*, **166**, p. 861, 1950.
Smith (K. M.) et Xeros (N.). — Studies on the cross-transmission of polyhedral viruses : experiment with a new virus from *Pyrameis cardui*, the painted lady butterfly. *Parasitol*, **43**, p. 178, 1953.
Snow (F. H.). — Contagious diseases of the chinch bug. *Ann. rep. Kansas Agr. Exp. St.*, **5**, p. 7, 1896.
Society of american bacteriologists. — Manual of methods for pure culture study of bacteria. Biotech Publications Geneva N. Y., 1952.
Speare (A. T.). — *Entomophtora* disease of the sugar cane mealy bug. *Hawai. Path. Physiol. Bull.*, **12**, p. 62, 1912.
Steinhaus (E. A.). — Insect microbiology. Comstock, 1947.
Steinhaus (E. A.). — Insect Pathology : the field concerned, training required, and opportunities possible. *Canad. Entomol.*, **81**, p. 1, 1949 *a*.
Steinhaus (E. A.). — Principles of Insect pathology. Mc. Graw. Hill, p. 17, 1949 *b*.
Steinhaus (E. A.). — Taxonomy of Insect viruses. *Ann. New-York Acad. Sci.*, **56**, p. 528, 1953.
Steinhaus (E. A.). — The effects of disease on insect populations. *Hilgardia*, **23**, p. 197, 1954.
Steinhaus (E. A.) et Jerrel (E. A.). — Further observations on *Bacillus thuringiensis* Berliner and other sporeforming bacteria. *Hilgardia*, **23**, p. 1, 1954.
Stevenson (J. A.). — The green muscardine fungus in Porto Rico. *J. Dept. Agr. Porto Rico*, **2**, p. 19, 1918.
Stutzer (M. J.) et Wsorow (W. J.). — Uber Infektionen der Raupen der Wintersaateule (*Euxoa segetum* Schiff.). *Zbl. Bakt. Paras. Inf.*, **71**, p. 120, 1927.
Suzuki (S.). — Abnormalism of cocoon filaments spun by virus diseased silkworms. *J. Seric. Sc. Japan*, **20**, p. 1, 1951.
Tamura (K.). — Sur la flacherie des vers. *Bull. Ass. Ser. Jap.*, n° 139, 1903.
Tarasevitch (M. M.). — Obtention de jeune Vers à soie exempts de grasserie. *Mikrobiologija*, **19**, p. 364 (trad.), 1950.
Tauber (O. E.). Mitotic response of roach hemocytes to certain pathogenes in the hemolymph. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, **83**, p 113, 1940.
Teodoro (G.). — Sopra una nuova malattia del baco da seta descritta dal Glaser. *Boll. Ser. Milano*, n° 34, p. 10, 1925.
Teodoro (G.). — La macilenza del baco da seta. *Boll. R. Staz. Sper. Gels. Bach. Ascoli Piceno*, **7**, p. 1, 1928.
Tomei (B.). — Il baco da seta. Catania, p. 55, 1924.
Toumanoff (C.). — Les maladies des abeilles. *Rev. Franc. Apic.*, p. 67 et 214, 1951.
Toumanoff (C.). — A propos d'un caractère différentiel de *Bacillus cereus* var. *alesti* Toum. et Vago agent pathogène de la flacherie infectieuse des Vers à soie. *Ann. Inst. Pasteur*, **87**, p. 485, 1954.
Toumanoff (C.). — Les maladies microbiennes et l'immunité naturelle chez les insectes. *Rev. Canad. Biol.*, **8**, p. 3, 1949.
Toumanoff (C.) et Vago (C.). — L'agent pathogène de la flacherie des Vers à soie endémique dans la région des Cévennes : *Bacillus cereus* var. *alesti* var. nov., *C. R. Acad. Sc.*, **233**, p. 1504, 1951.
Toumanoff (C.) et Vago (C.). — La nature de l'affection des Vers à soie due à *Bacillus cereus* var. *alesti* Toum. et Vago et les modalités d'action de ce bacille. *Ann. Inst. Pasteur*, **83**, p. 421. 1952,
Toumanoff (C.) et Vago (C.). — Étude histopathologique des Vers à soie atteints de *Bacillus cereus* var. *alesti Ann. Inst. Pasteur*, **84**, p. 376, 1953 *a*.
Toumanoff (C.) et Vago (C.). — Recherches sur l'effet toxique de *Bacillus cereus* var. *alesti* vis-à-vis des Vers à soie. *Ann. Inst. Pasteur*, **84**, p. 623, 1953 *b*.

TOUMANOFF (C.), et VAGO (C.). — Sur la virulence vis-à-vis du ver à soie de quelques *cereus* entomophytes en tant que test de comparaison. *Ann. Inst. Pasteur*, **88,** p. 388, 1955.

TOUMANOFF (C.), et VAGO (C.) et GLADILINE (C.). — Recherches sur l'effet toxique de *Bacillus cereus* var. *alesti* vis-à-vis des Vers à soie (2e partie). *Ann. Inst. Pasteur*, **86,** p. 438, 1954.

TUBEUF (Von C.). — Die Krankheiten der Nonne (Liparis monacha). *Naturwiss. Z.*, **1,** p. 34, 1892.

VAGO (C.). — Un nouveau type d'épizootie dans les élevages des Vers à soie. *C. R. Acad. Agr.*, **36,** p. 530, 1950.

VAGO (C.). — « La flacherie endémique des Cévennes » et ce qu'elle représente dans la sériciculture cévenole. *C. R. Acad. Agr.*, **37,** p. 593, 1951 *a*.

VAGO (C.). — Phénomènes de « Latentia » dans une maladie à ultravirus des insectes. *Rev. canad. Biol.*, **10,** p. 299, 1951 *b*.

VAGO (C.). — Homogénéisation des tests symptomatologiques pour l'étude statistique de la maladie des « Morts-vivants » du *Bombyx mori*. *Rev. du Ver à soie*, **3,** p. 193, 1951 *c*.

VAGO (C.). — Emploi du bleu Victoria pour la mise en évidence des polyèdres dans les maladies à ultravirus d'insectes. *Bull. Microsc.*, **2,** p. 21, 1952 *a*.

VAGO (C.). — Maladies latentes et tolérance symbiotique chez les invertébrés. *C. R. Congr. Intern. path. comp. Madrid*, p. 121, 1952 *b*.

VAGO (C.). — Sur l'emploi, dans la mise en évidence des spores microbiennes, d'un colorant polyvalent assurant la décoloration dissolution, du colorant et la contre coloration. *Rev. Belge Path. Med. Exp.*, **22,** p. 129, 1952 *c*.

VAGO (C.). — La polyèdrie de *Thaumetopoea pityocampa*. *Ann. Epiphyt.*, **3,** p. 319, 1953 *a*.

VAGO (C.). — Facteurs alimentaires et activation des viroses latentes chez les insectes. *C. R. VIe Congr. Int. Microbiol. Rome*, **5,** p. 556, 1953 *b*.

VAGO (C.). — Action du permanganate de potassium comme désinfectant sur œufs d'insectes vis-à-vis des viroses. *Bull. Soc. Zool.*, **74,** p. 138, 1954 *a*.

VAGO (C.). — Limites biologiques du traitement désinfectant, sur œufs d'insectes à l'hydroxyde de potassium contre les virus du groupe *Borrelina*. *C. R. Soc. Biol.*, **148,** p. 255, 1954 *b*.

VAGO (C.). — Les viroses des insectes et leurs phases inapparentes. *Conférence Soc. Génét., Paris*, 1955 *a*.

VAGO (C.). — Lutte contre les maladies du Ver à soie par de nouveaux systèmes de magnaneries. *Act. Conf. Tech. Ser. Intern. Alès*, p. 63, 1955 *b*.

VAGO (C.). — Actions virusales indirectes. *I. Symp. Europ. Path. Insect. Darmstadt* (*sous presse*), 1956.

VAGO (C.) et CHASTANG (S.). — Isolement par micro-ampoules des agents pathogènes cryptogamiques à partir d'insectes mycocés (*sous presse*).

VAGO (C.), CROISSANT (O.) et LÉPINE (P.). — Démonstration au microscope électronique du développement intranucléaire du virus de la grasserie. *Ann. Inst. Pasteur*, **89,**, p. 364, 1955.

VAGO (C.) et CAYROL (R.). — Une virose à polyèdres de la Noctuelle gamma. *Plusia gamma L.* (*Lepidoptera*) *Ann. des Epiph.*, **6,** p. 421, 1955.

VAGO (C.) et HAUDUROY (P.). — Résistance à la lyophilisation du virus de la polyèdrie de *Thaumetopoea pityocampa* Schiff (*Lepidoptera*). *Ann. van. Leew.*, **20,** p. 141, 1954.

VAGO (C.) et VASILJEVIC (L.). — Emploi de l'extrait d'œuf de *Bombyx mori* pour la culture et l'isolement des cryptogames et bactéries entomophytes. *Rev. du Ver à soie*, **6,** p. 161, 1954.

VAGO (C.) et VASILJEVIC (L.). — Une virose à localisation intestinale avec affinité cytoplasmique chez le Lépidoptère *Thaumetopoea processionea* L. *Ant. van. Leew.*, **21,** p. 210, 1955.

Veneroso (A.). — Sulla eventuale presenza di alcune sostanze nel sangue e nei tessuti del baco da seta affetto da flaccidezza. *Boll. R. St. Sper. Gels. Bach. Ascoli Piceno,* **8,** p. 5, 1929.

Veneroso (A.). — La malattia della polyedria nel *Bombyx mori* L. provocata da foglia intossicata da fluori. *Boll. R. Staz. Sper. Gels. Bach. Ascoli Piceno,* **13,** p. 147, 1934.

Verson (E.). — Studo intorno alla letargia del filugello. *Ser. austriaca, Gorizia.,* **4,** p. 25, 1869.

Verson (E.). — Altre osservazioni sulla flaccidezza del baco da seta. *Atti II. Congr. Bac. Intern. Udine,* p. 40, 1871.

Verson (E.). — Sulla natura della malattia denominata flaccidezza. *Ann. R. Staz. Sper. Padova,* 1, 1872.

Verson (E.). — I butteri e la cause delle flaccidezza. *Boll. di Bachicolt.,* 9, 1891.

Verson (E.). — Sulle cause che posseno determinare la flaccidezza. *Ann. R. Staz. Sper. Padova.,* **34,** 1906.

Verson (E.) et Quajat (E.). — Se la flaccidezza sia malattia infezione. *Ann. R. Staz. Padova,* **1,** 1872.

Verson (E.) et Vlacovich (G. P.). — Sur la gattine et la flacherie. *Act. 4 Congr. Ser. Inter. Montp.,* p. 175, 1875.

Vlacovich (G. P.) et Verson (E.). — Sulla natura della malattia del baco denominate flaccidezza o letargia. *Ann. Staz. Sper. Padova.,* **1,** 1872.

Wahl (B.). — Uber die Polyederkrankheit der Nonne. (*Lymantria monacha L.*) *Centr. Ges. Forstw.,* **38,** p. 355, 1912.

Waldmann. — *Bull. Off. Internat. Epizoot.,* **3,** p. 737, 1930.

Wallengren (H.) et Johansson (R.). — On the infection of *Pyraustra nubilalis HB* by *Metarrhizium anisopliae* (Metch.). *Intern. Corn. Borer Invest. Sci. Repts,* **2,** p. 131, 1929.

White (G. F.). — Unheated egg-yolk media. *Science,* **5,** p. 49, 1919.

White (G. F.). — European foulbrood. *Bull. U. S. Dep. Agro.,* **810,** p. 39, 1920.

White (G. F.). — Hornworm septicemia. *J. Agr. res.,* **26,** p. 477, 1923 *a.*

White (G. F.). — Cutworm septicemia. *J. Agr. res.,* **26,** p. 487, 1923 *b.*

Wigglesworth (V. B.). — Wound healing in insect (*Rhodnius prolixus Hemiptera*) *J. Exptl. Biol.,* **14,** p. 364, 1937.

Wigglesworth (V. B.). — The principles of insect physiology. Methuen London, **63,** p. 233, 1947.

Wollman (E. L.). — Sur le déterminisme génétique de la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur,* **84,** p. 281, 1953.

Yamafuji (K.). — Conversion of nitrites into oximes in silkworms and its relation of the experimental production of virus disease. *Nature,* **165,** p. 651, 1950.

Yamafuji (K.). — Mechanism of artificial virus formation in silkworm tissues. *Enzymol.,* **15,** p. 223, 1952 *a.*

Yamafuji (K.). — Effect of nitrite on the nuclear structure in the silkworm. *Nature,* **170,** p. 126, 1952 *b.*

Yamafuji (K.). — Desoxyribonucleic acid and polyhedral virus. *Rep. Agr. Tech. Kyushu. Univ.,* **14,** p. 11, 1955 *a.*

Yamafuji (K.). — On the nature of viral precursors. *Rep. Agr. Tech. Kyushu. Univ.,* **14,** p. 1, 1955 *b.*

Yamafuji (K.), So (K.) et Soo (K.). — Die Wirkung des Seidenraupenpolye dervirus auf die Atmung und Katalase der Hefe. *Biochem. Z.,* **311,** p. 203, 1941.

Yamafuji (K.) et Shirozu (Y.). — Die Abhängigkeit der Neubildung des Virus-proteins von der Erniedrigung der Katalase. *Biochem. Z.,* **317,** p. 94, 1944.

YAMAFUJI (K.) et CHO (T.). — Weitere Studien über die Entstehung des Seidenraupenpolyedervirus ehne Virus-infektion. *Biochem. Z.*, **318,** p. 95, 1947.

YAMAFUJI (K.) et YUKI (T.). — Uber die Vorbeugung der Viruskrankheit durch Fütterung mit Katalase beim Seidenspinner. *Biochem. Z.*, **318,** p. 107, 1947.

YAMAFUJI (K.), OMURA (H.) et YOSHIHARA (F.). — Effect of chemicals on the virus infection in silkworms. *Enzym.*, **15,** p. 28, 1951.

YAMAFUJI (K.) et YOSHIHARA (F.). — Procedures for the chemical production of silkworm virus. *Enzym.*, **15,** p. 10, 1951.

YAMAFUJI (K.), YOSHIHARA (F.) et OMURA (H.). — Expérimental virus production in a canadian strain of silkworm. *Enzym*, **15**, p. 182. 1952.

YAMAFUJI (K.), AKITA (T.) et NAMBA (I.). — Relation between infectious ability of silkworm polyhedra and virus-producing substances. *Enzym.*, **15,** p. 215, 1952.

YAMAFUJI (K.) et ETO (M.). — Some experiments on the relation between polyhedrosis virus and gene. *J. Agr. Chem. Jap.*, **26,** p. 409, 1952.

YEAGER (J. F.). — Blood picture *Prodenia* (Lepidoptera), *J. Agr. Res.*, **71,** p. 1, 1945.

ZERNOFF (V.). — Les bactériolysines chez les insectes. *Ann. Inst. Pasteur*, **46,** p. 365, 1931.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction

CHAPITRE PREMIER

Méthodes et matériel

Méthodes cyto et histo-pathologiques 12
Méthodes microbiologiques 14
Méthodes de pathologie expérimentale 15
Matériel biologique 17

CHAPITRE II

Historique 19

CHAPITRE III

Complexe oligo-infection bactérienne-Flacherie 20
a) Origine de la mise en évidence du complexe. Problèmes étiologiques relatifs à la flacherie du Ver à soie 20
b) Obtention d'effets subléthaux prolongés avec *Bacillus cereus alesti* 24
c) Évolution du processus pathologique vers le syndrome de la flacherie 27
d) Histopathologie 37
e) Rôle de la toxicité bactérienne 38
f) Comparaison du syndrome final avec ceux de la « gattine » et de la « flacherie » 44
g) Conclusions 46

CHAPITRE IV

Complexe virose-Septicémie bactérienne 49
a) Origine de la mise en évidence du complexe. Les septicémies à agents facultativement pathogènes 49
b) Co-infection virale inapparente 54
c) Études expérimentales des rapports entre viroses et septicémies 56
d) Accélération de l'effet léthal 61
e) Pathogénèse du complexe 63
f) Conclusions 68

Chapitre V

Complexe blessure-Infection microbienne 70
a) Historique de la mise en évidence du complexe 70
b) Étude expérimentale des rapports entre blessures et infections ultérieures 77
c) Pathogénèse du complexe 87
d) Influence de la guérison sur l'efficacité de l'infection secondaire 103
e) Conclusions 104

Chapitre VI

Complexe affections subaiguës-État « ver court » 107
a) Origine de la mise en évidence du complexe. Problème des « vers courts » et essais de définition de cet état pathologique 107
b) Observations relatives à l'influence d'affections pathologiques sur la formation des « vers courts » 111
c) Reproduction expérimentale de complexes entre affections primaires et « vers courts » 118
d) Pathogénèse du complexe 124
e) Conclusions 128

Chapitre VII

Complexe troubles métaboliques-Virose aiguë 130
a) Origine de la mise en évidence du complexe. Problème du rôle des facteurs abiotiques dans l'évolution des polyèdries 130
b) Observations de cas spontanés de viroses conditionnées par des effets primaires 132
c) Essais de provocation des viroses avec exclusion d'infections préalables 137
d) Variations de réceptivité 142
e) Facteurs de la « non apparition » 145
f) Aspects histopathologiques 147
g) Tentatives d'explication de la pathogénèse. Phénomènes de latence 150
h) Conclusions 153

Chapitre VIII

Considérations et conclusions générales 155
I. — Facteurs d'interactions pathologiques 155
Nature des affections formant un enchaînement 156
Facteurs intermédiaires de liaison 159
Rôle de l'intensité des affections 160
Les microbes de sortie 161
Préexistence des germes 161
Enchaînements à phases multiples 162
Rapports chronologiques et topographiques 163
Relations avec l'ontogénèse 163
Influence d'ordre génétique 164
II. — Conclusions générales 166
Références 169

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DES VIROSES D'INSECTES

VU ET APPROUVÉ :

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

P. CHOUX.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Aix-en-Provence le 19 mai 1956.

Le Recteur,

J. BLACHE.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 30-7-1959.

Dépôt légal : 3e trimestre 1959 *N° d'impression : 97*